

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR  
SÉBASTIEN HOULE

PLASTICITÉ DES RÉFLEXES SOMATO-RÉNAUX INDUITE PAR  
LA DOULEUR VERTÉBRALE CHRONIQUE

JUILLET 2012

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## AVANT-PROPOS

Ma formation clinique, mes années d'expérience comme interne à la clinique universitaire ainsi que mon début de pratique comme clinicien ont soulevé différentes questions pour moi quant aux effets thérapeutiques rapportés par certains au niveau viscéral. De plus, lors de ma formation chiropratique, j'ai eu la chance de faire un stage de recherche sur différents projets en lien avec les interactions somato-autonomiques chez l'humain. Ma curiosité et le désir de mieux comprendre les mécanismes de base entre la douleur et les fonctions somato-autonomiques m'ont dirigé vers le projet de recherche présenté dans ce mémoire.

Plusieurs personnes m'ont soutenu moralement et financièrement tout au long de la maîtrise. Je tiens d'abord à remercier mon directeur, le Dr Mathieu Piché, pour sa grande disponibilité, son engagement, sa rigueur et son sens critique développé. Il a sans aucun doute favorisé le développement de mon autonomie, ce qui me sera fort utile lors de ma carrière professionnelle.

Je remercie également le Dr Djamel Ramla pour son support, ses bons conseils et pour avoir contribué à ma formation. Merci aussi au Dre Harumi Hotta, chercheuse senior à l'institut métropolitain de Gérontologie de Tokyo, d'avoir collaboré à notre projet et partagé avec moi ses expériences sur le système nerveux autonome chez le rat.

Merci au Dr Michel Cyr et au Groupe de recherche en Neurosciences qui contribuent à la formation des étudiants gradués. Merci aussi au Dr Martin Descarreaux et au Groupe de recherche sur les affections neuro-musculo-squelettiques.

Un gros merci au Dr Gilles Bronchti et toute son équipe pour les nombreux et agréables échanges que nous avons eus. Je tiens particulièrement à remercier le Dr Bronchti pour la solide formation qu'il m'a apportée en anatomie et neuroanatomie, ainsi que pour m'avoir dirigé vers le Dr Piché lorsque j'ai manifesté un intérêt pour la recherche et les études supérieures.

Mes plus sincères remerciements aux membres de la clinique Triade Santé qui m'ont permis de garder un contact avec ma pratique professionnelle et qui m'ont encouragé tout au long de la maîtrise.

Je remercie également mes collègues au laboratoire, M. Renaud Jeffrey-Gauthier pour sa grande amitié et sa collaboration, ainsi que Mme Alexandra Ladouceur pour son aide et sa gentillesse. J'aimerais également remercier les différents stagiaires et l'équipe de l'animalerie pour leur support technique. Je remercie le Dr Robert Perron et l'équipe du laboratoire de pathologie du centre hospitalier régional de Trois-Rivières pour leur assistance. Un merci tout spécial à mes parents et ma famille qui m'ont toujours supporté dans mes études.

En terminant, je remercie ma merveilleuse conjointe, Mme Judith Genest, pour ses encouragements, ses conseils, son immense compréhension et surtout pour le plus beau sourire du monde.

Merci beaucoup à la fondation de recherche Chiropratique du Québec et à la Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières pour leur soutien financier essentiel.

## RÉSUMÉ

Les recherches animales des 40 dernières années sur les interactions somato-autonomiques ont permis de comprendre comment les fonctions du système nerveux autonome peuvent être influencées par des stimulations somatiques. Ainsi, des stimulations appliquées sur les membres peuvent induire des réflexes sympathiques en provenance du cerveau, pouvant moduler l'activité des organes. En plus de ces réflexes d'origine cérébrale, une stimulation des tissus du tronc peut également induire des réflexes segmentaires en provenance de la moelle épinière. Les résultats de ces différentes études sont cependant limités aux stimuli aigus. Ainsi, les effets néfastes de la douleur vertébrale chronique sur le système nerveux autonome et la fonction de certains organes n'ont jamais été documentés. Les deux objectifs de ce projet étaient 1) de mettre au point un modèle animal de douleur vertébrale chronique et 2) de déterminer si la douleur vertébrale chronique peut altérer les fonctions du système nerveux autonome, notamment les changements de débit sanguin rénal induits par des stimulations nociceptives.

Chez des rats Wistar anesthésiés à l'uréthane, des stimulations électriques de la patte postérieure ont été appliquées pour produire des changements de débit sanguin rénal, mesurés à l'aide d'une sonde laser-doppler. Dans une première expérience, des stimulations électriques d'intensité croissante ont été appliquées afin d'obtenir une courbe stimulus-réponse. Pour la deuxième expérience, une solution de NaCl 6 % a été injectée dans les muscles paravertébraux de T2 ou T10. Pour déterminer l'effet de la douleur chronique vertébrale, l'amplitude des changements de débit sanguin rénal observée lors des 2 expériences a été comparée chez trois groupes de rats : un groupe contrôle, et deux groupes avec douleur chronique (l'un à T10 et l'autre à T2), ayant reçu une injection d'adjuvant complet de Freund (150  $\mu$ L i.m) dans les muscles paravertébraux, 12 jours avant l'expérimentation.

L'amplitude des changements de débit sanguin rénal évoqués par les stimulations de la patte postérieure était diminuée chez les rats ayant reçu une injection d'adjuvant complet de Freund à T2 par rapport aux rats contrôles. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les groupes pour l'injection de la solution saline (NaCl 6%) dans les muscles paravertébraux, que ce soit pour les injections à T2 ou à T10.

Ces résultats indiquent que la douleur vertébrale chronique peut altérer les réflexes somato-autonomiques, notamment la régulation du débit sanguin rénal, et ces changements sont particulièrement évidents lors d'une stimulation nociceptive des tissus cutanés de la patte postérieure. Les changements observés pourraient s'expliquer par plusieurs mécanismes dont 1) une augmentation de l'activité tonique des neurones sympathiques

préganglionnaires, qui pourrait diminuer l'amplitude relative des changements phasiques induits par des stimulations nociceptives 2) une activation des mécanismes de modulation descendante de la nociception spinale et 3) des changements cardiovasculaires affectant la physiologie rénale. D'autres expériences seront nécessaires afin de clarifier l'implication de ces mécanismes.

**Mots clés :** Sympathique, réflexe somato-autonomique, douleur, paravertébral.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>x</b>
 <b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités .....	1
1.2 Système nerveux autonome .....	1
1.2.1 Afférences autonomiques .....	2
1.2.2 Organisation autonome sympathique .....	4
1.2.3 Organisation autonome parasympathique .....	8
1.2.4 Organisation sympathique rénale .....	8
1.2.5 Modes de régulation du système nerveux autonome .....	10
1.3 Réflexes somato-autonomiques .....	11
1.3.1 Réflexe somato-sympathique .....	14
1.3.2 Réflexe somato-rénal .....	16
1.3.3 Modulation du réflexe somato-rénal .....	16
1.4 Fonctions de l'innervation sympathique rénale .....	18
1.5 Influences du système cardiovasculaire .....	20
1.6 Hormones du stress et douleur chronique .....	21
1.7 Nociception et système nerveux autonome .....	22
1.7.1 Les nocicepteurs .....	22
1.7.2 Effets de la myosite .....	23
1.7.3 Rôle des cytokines sur la chronicisation de la douleur .....	26
1.7.4 Modulation autonome par des stimuli nociceptifs et non nociceptifs .....	27
1.7.5 Spécificité des stimulations thoraciques .....	28
1.8 Objectifs de la recherche .....	28
1.8.1 Objectifs spécifiques .....	29
1.8.2 Importance et originalité de la recherche .....	29

<b>CHAPITRE II</b>	
<b>CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES .....</b>	<b>30</b>
2.1 Anesthésie à l'uréthane .....	30
2.2 Induction de la myosite .....	30
2.3 Fixation et prélèvements des muscles.....	31
2.4 Circulation universelle .....	31
2.5 Inclusion à la paraffine et coupe au microtome .....	31
2.6 Coloration des tissus .....	31
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>ARTICLE .....</b>	<b>33</b>
3.1 Contribution des co-auteurs de l'article .....	33
3.2 Résumé .....	34
3.3 Article scientifique.....	35
<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
4.1 Impact de la douleur chronique sur les réponses somato-autonomiques lors de stimulations de la patte postérieure (expérience 1).....	60
4.2 Mécanismes de modulation des changements de débit sanguin rénal lors de stimulations du tronc (expérience 2) .....	66
4.3 Limites de l'étude.....	70
4.4 Application des résultats.....	70
4.5 Perspectives de futures recherches .....	71
4.6 Changements nécrotiques du rein : un cas intrigant.....	73
4.7 Conclusion.....	74
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>76</b>



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure	Page
1.1 Schéma du système nerveux autonome .....	3
1.2 Schéma démontrant l'organisation segmentaire préganglionnaire et le parcours de l'axone vers le ganglion autonome.....	6
1.3 Chaîne ganglionnaire sympathique, et sa localisation anatomique dans la région cervicale et dans les cavités thoraciques, abdominales et pelviennes .....	7
1.4 Distribution longitudinale des neurones infectés par le rein (virus pseudo-rabique) au sein de la moelle épinière thoracique. ....	10
1.5 Schématisation du réflexe somato-autonomique spinal .....	12
1.6 Voies des réponses réflexes somato-autonomiques et somato-somatiques .....	13
1.7 Schématisation du réflexe A et du réflexe C.....	14
1.8 Composantes du réflexe-A .....	15
1.9 Réponses de la pression artérielle moyenne et du nerf sympathique rénal gauche suite à des stimulations somatiques (pincement au niveau de la peau).....	18
1.10 Impacts systémiques de l'innervation sympathique rénale (A-D). ....	20
1.11 Histologie d'un muscle à l'état inflammatoire.....	25
1.12 Histologie d'un muscle à l'état normal .....	25

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.1 Schéma des contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive .....	64
4.2 Schéma des réponses somato-rénales .....	69
4.3 Impact d'une augmentation de la dose de CFA.....	73
4.4 Histologie d'un rein normal (A) et d'un rein pathologique avec nécrose tubulaire (B).....	74

### **Tableau**

1.1 Classification des types de fibres nerveuses afférentes .....	4
2.1 Procédure de coloration des tissus.....	32

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

CFA	Adjuvant complet de Freund
CFAT10	Groupe avec douleur chronique à T10
CFAT2	Groupe avec douleur chronique à T2
CTL	Groupe contrôle
MAP	Pression artérielle moyenne
RBF	Débit sanguin rénal
HR	Fréquence cardiaque
IL-1 $\beta$	Cytokines interleukines-1 $\beta$
TNF- $\alpha$	Cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$
IASP	International Association for the Study of Pain
HTM	High-threshold mechanosensitive
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
CIDN	Contrôles inhibiteurs diffus noceptifs

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

### **1.1 Généralités**

La fin du 19<sup>e</sup> siècle a vu apparaître les bases physiologiques modernes sur l'anatomie et le fonctionnement du système nerveux autonome (Langley 1891; Purves et al. 2001). Des travaux au début du 20<sup>e</sup> siècle se sont aussi intéressés aux effets de stimulations somatiques sur le système nerveux (Sherrington 1906). Quant aux recherches animales des 40 dernières années sur les interactions somato-autonomiques, elles ont permis de comprendre comment les fonctions du système nerveux autonome peuvent être influencées par des stimulations somatiques (Sato et al. 1997). Ainsi, des stimulations appliquées sur les membres peuvent induire des réflexes sympathiques en provenance des centres supérieurs, qui peuvent moduler l'activité des organes. En plus de ces réflexes supraspinaux, une stimulation des tissus du tronc peut également induire des réflexes segmentaires en provenance de la moelle épinière (Kimura et al. 1996; Budgell and Suzuki 2000). Les résultats de ces différentes études sont cependant limités aux stimuli aigus. Les effets de l'activation soutenue des nocicepteurs sur une période de plusieurs jours n'ont jamais été investigués. Dans le présent projet, nous avons étudié l'impact d'une douleur vertébrale chronique, chez un modèle animal (rat), sur une fonction sympathique spécifique, soit la régulation du débit sanguin rénal.

### **1.2 Système nerveux autonome**

Le système nerveux autonome contrôle les fonctions involontaires qu'exercent les fibres musculaires lisses, les fibres musculaires cardiaques et le système endocrinien (figure 1.1). Le système autonome est divisé en

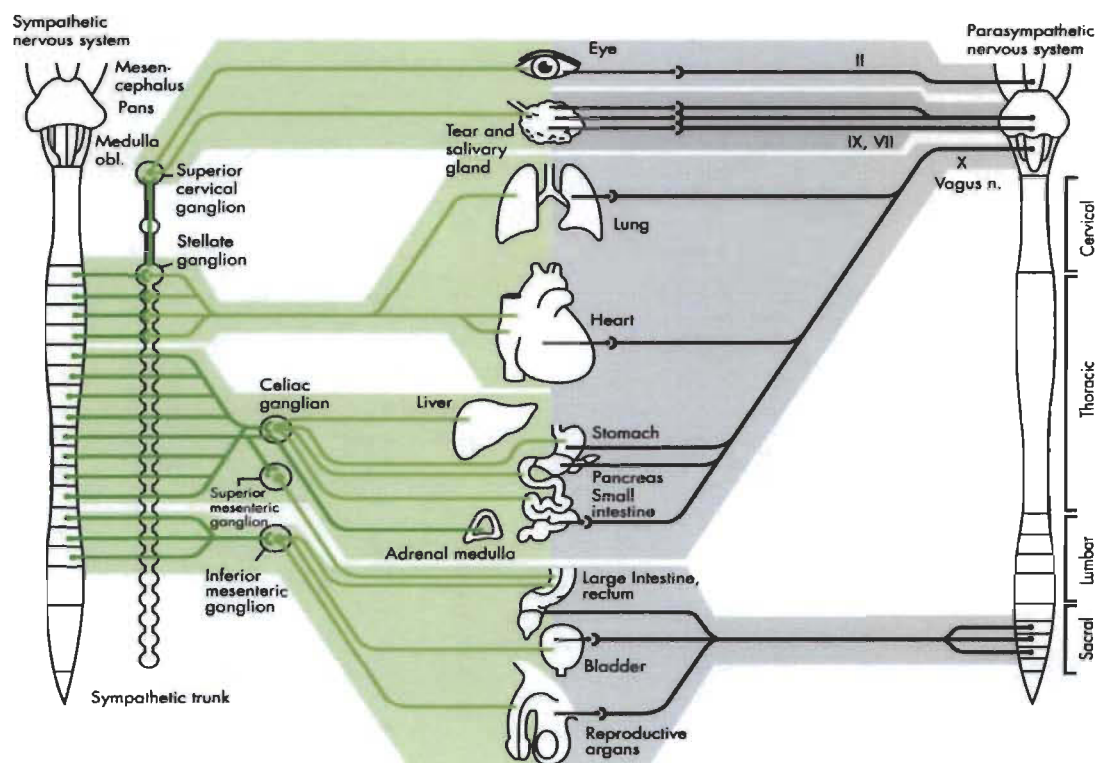
trois parties : le système nerveux sympathique, le système nerveux parasympathique et système nerveux entérique (Purves et al. 2001). Ce dernier contingent, semi-indépendant, ne sera pas détaillé dans ce mémoire. Le système nerveux sympathique a pour rôle de préparer l'organisme à des situations de combat ou de fuite (« fight or flight ») (Cannon 1929). Cette portion du système nerveux mobilise les ressources de l'organisme pour le préparer à l'action, par exemple, en augmentant la fréquence cardiaque et la force de contraction du cœur, en dilatant la pupille et en augmentant la sécrétion des catécholamines. De manière générale, le système nerveux parasympathique est opposé au rôle métabolique du système sympathique. Le système nerveux parasympathique restaure l'énergie utilisée et intervient majoritairement dans les états de calme (Purves et al. 2001). À titre d'exemple, l'activité parasympathique va donc induire une diminution de la fréquence cardiaque, ainsi qu'une constriction pupillaire.

### **1.2.1 Afférences autonomiques**

L'information transmise au système nerveux autonome provient d'afférences viscérales et d'afférences somatiques sensorielles. La fonction conventionnelle des neurones afférents viscéraux est de transmettre les signaux physiques, tels la distension ou la contraction d'un organe, et les signaux chimiques (Jänig 2006). Les chimiorécepteurs qui enregistrent la concentration sanguine de dioxyde de carbone est un exemple de signal chimique. La transmission de ces signaux physiques et chimiques mène à la régulation des organes, à des réflexes ainsi qu'à des sensations distinctes. Les neurones afférents viscéraux peuvent être divisés en neurones viscéraux vagues et neurones viscéraux spinaux.

Les neurones viscéraux vagues envoient des projections noyau du tractus solitaire. Les neurones du noyau du tractus solitaire envoient ensuite des projections au tronc cérébral, à l'hypothalamus et à l'amygdale, établissant des

voies neuronales pour la régulation des différentes fonctions des organes. Les neurones viscéraux vagues sont principalement reliés au système respiratoire, au système cardiovasculaire et au tractus gastro-intestinal (Jänig 2006).



**Figure 1.1 : Schéma du système nerveux autonome.** Tiré de « The Integrative action of the autonomic nervous system » (Jänig 2006). Le système nerveux sympathique est illustré en vert, alors que le système nerveux parasympathique est illustré en gris.

Les neurones viscéraux spinaux envoient des projections vers la moelle épinière. Ces projections provenant de différents organes sont organisées de manière segmentaire et atteignent les lames I et V de la corne dorsale, ainsi que les lames VI, VII et X. Certaines afférences envoient aussi des projections contralatéralement aux lames V et X. Les neurones viscéraux afférents thoracolombaires sont impliqués dans les réflexes intestino-intestinaux et d'autres réflexes spécifiques des organes, comme par exemple, le réflexe réno-rénal. Les organes pelviens ont une double innervation, soit les neurones afférents viscéraux spinaux et les neurones afférents viscéraux sacrés. La

composante sacrée est essentiellement pour les fonctions d'évacuation, les organes reproducteurs ainsi que les sensations douloureuses et non douloureuses des organes pelviens. Les neurones afférents viscéraux spinaux font synapse avec un neurone segmentaire, un interneurone propriospinal ou un neurone projetant aux centres supra-spinaux. Les neurones de la lame I et des lames V-VII projettent au thalamus, l'hypothalamus et au tronc cérébral (Jänig 2006).

De manière générale, les fibres nerveuses afférentes font aussi l'objet de diverses classifications et la nomenclature peut varier d'une étude à l'autre. Le résumé des 2 classifications les plus utilisées (Léger et al. 2000), soit la classification de Lloyd et la classification d'Erlanger et Gasser est présentée au tableau 1.1.

**Tableau 1.1**  
Classifications des types de fibres nerveuses afférentes

<b>Classification de Lloyd</b>	<b>Classification d'Erlanger et Gasser</b>	<b>Rôle physiologique principal</b>
Fibres afférentes du groupe I (Ia et Ib)		
Fibres afférentes du groupe II	Fibres A (fibres myélinisées)	Afférences somatiques et proprioceptives
Fibres afférentes du groupe III		
Fibres afférentes du groupe IV	Fibres C (fibres non myélinisées)	Afférences cutanées et musculaires

### 1.2.2 Organisation autonome sympathique

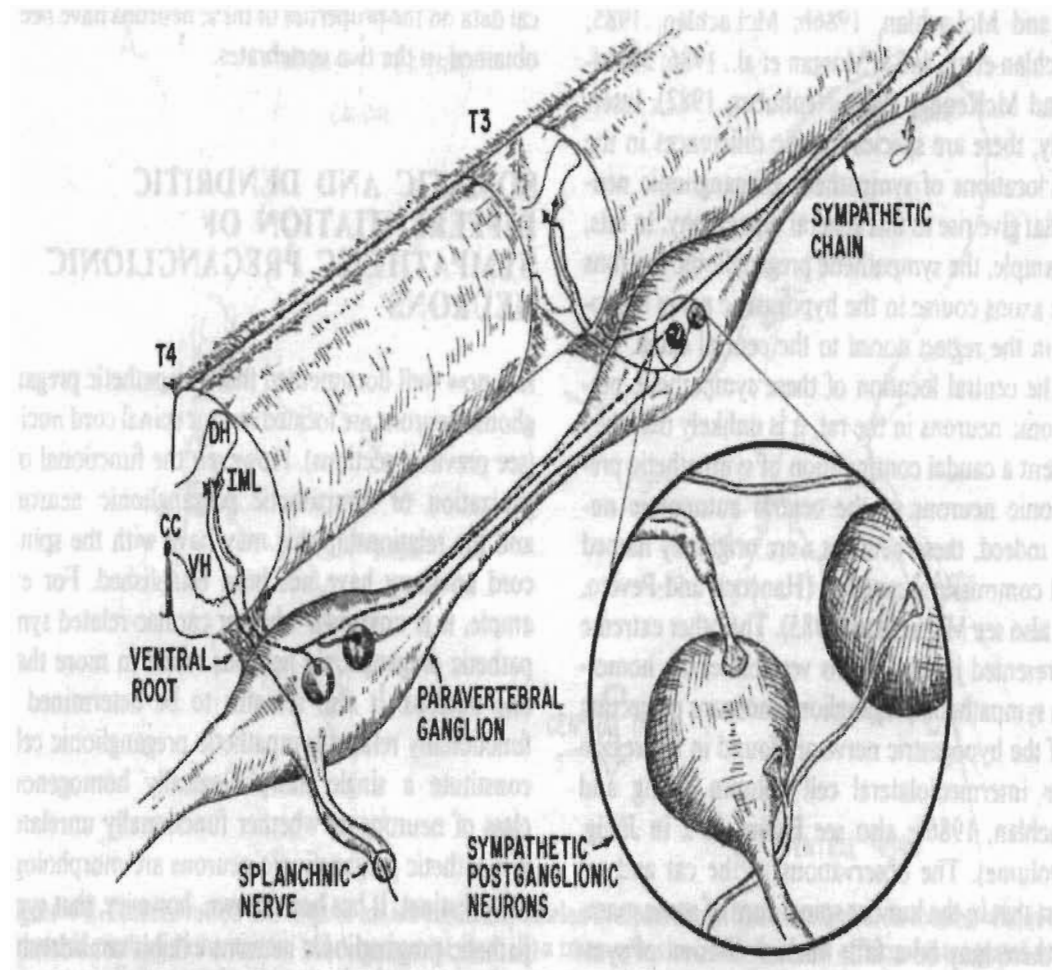
Le système nerveux sympathique périphérique est constitué de 2 populations de neurones telles qu'illustrées à la figure 1.1.

Le premier type de neurone est le neurone préganglionnaire. D'un point de vue anatomique, chez l'humain, les neurones préganglionnaires sympathiques forment les colonnes intermediolatérales et intermediomédiales entre le premier segment thoracique et le 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> segment lombaire (Baron et al. 1995; Purves et al. 2001; Jänig 2006). Chez le rat, l'organisation sympathique est semblable; les neurones préganglionnaires sont concentrés au niveau de quatre régions de la substance grise de la moelle épinière; soit le nucleus intermediolateralis pars principalis, le nucleus intermediolateralis pars funicularis, le nucleus intercalatus spinalis et le nucleus intercalatus pars paraependymalis (Pyner and Coote 1994). La figure 1.3 illustre la chaîne ganglionnaire sympathique. Distalement, la chaîne sympathique thoracolombaire s'étend des niveaux T12 à L5. Ce tronc sympathique se situe dans l'espace rétropéritonéal antérieurement à la colonne vertébrale et postérieurement aux gros vaisseaux i.e. l'aorte et la veine cave inférieure. Au niveau de l'organisation sympathique, il existe une exception dans la région lombaire basse et sacrée de la chaîne ganglionnaire où les rameaux communicants blancs n'existent pas. Les neurones préganglionnaires envoient leurs axones de la moelle épinière pour faire synapse avec les dendrites et corps cellulaires des neurones postganglionnaires au sein des ganglions. Ces efférences sont envoyées via les racines ventrales de la moelle épinière et les rameaux communicants blancs. La figure 1.2 montre le parcours de l'axone du neurone préganglionnaire.

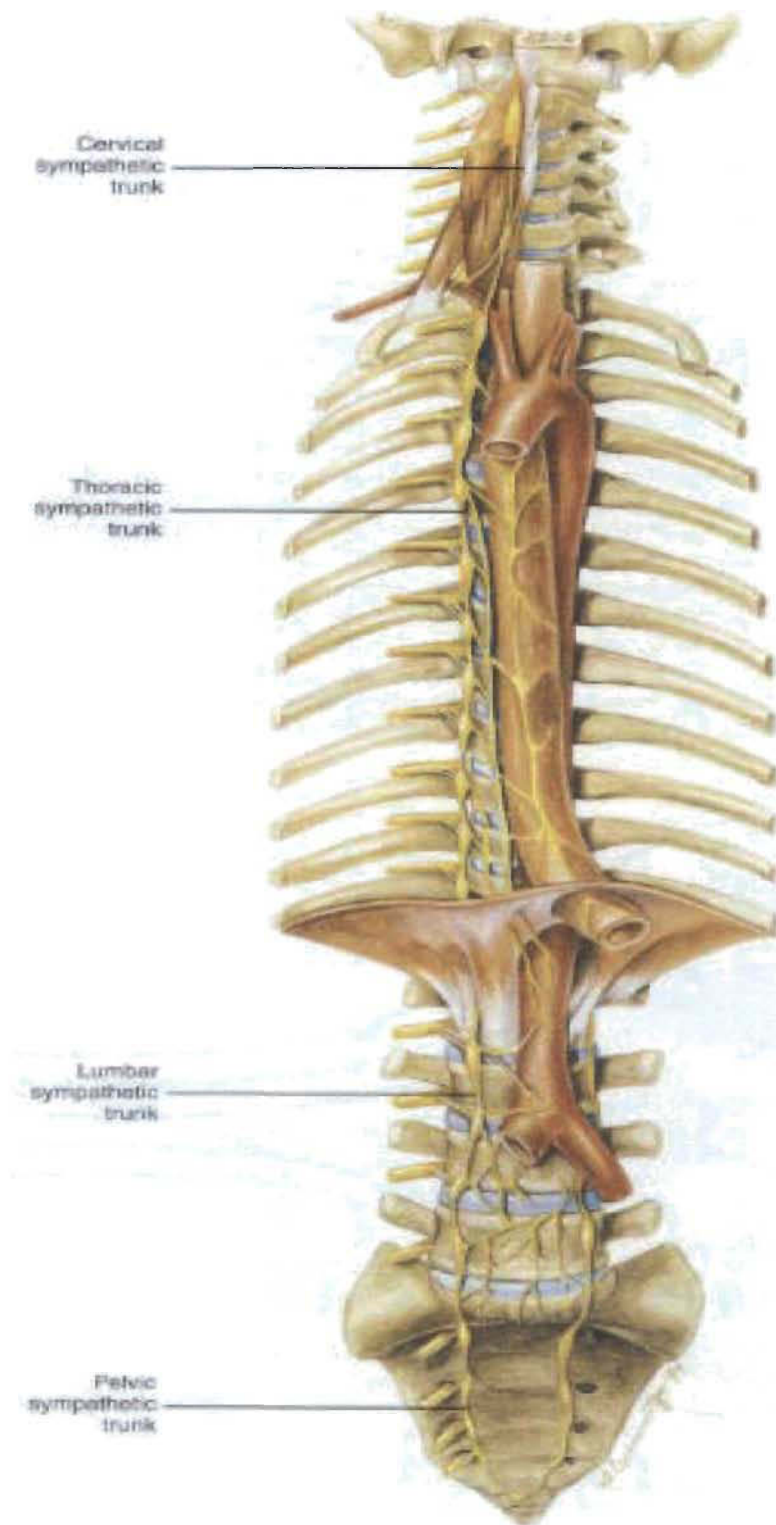
Le deuxième type de neurone est le neurone postganglionnaire. Celui-ci innerve les tissus cibles périphériques jusqu'à la cellule effectrice du tissu somatique ou de l'organe cible. Leurs corps cellulaires se regroupent dans les ganglions autonomiques et reçoivent les efférences préganglionnaires. Plus précisément, ces efférences préganglionnaires projettent soit 1) au niveau des ganglions paravertébraux (chaîne sympathique), soit 2) par différents nerfs splanchniques (grand, petit, inférieur et lombaire) en se terminant au niveau de l'abdomen dans les ganglions prévertébraux e.g. coélique, aortico-rénal, mésentérique supérieur, mésentérique inférieur ou plexus, soit 3) par les nerfs



hypogastriques terminant dans les ganglions splanchniques pelviens (Jänig 2006).



**Figure 1.2 : Schéma démontrant l'organisation segmentaire préganglionnaire et le parcours de l'axone vers le ganglion autonome.** (T3-T4 : segments de la moelle épinière; DH : corne dorsale; VH : corne ventrale; CC : canal central; IML : noyau intermédiolatéral). Tiré de Central regulation of autonomic functions (Loewy and Spyer 1990).



**Figure 1.3 :** Chaîne ganglionnaire sympathique, et sa localisation anatomique dans la région cervicale et dans les cavités thoraciques, abdominales et pelviennes. Tiré de Basic and clinical anatomy of the Spine, Spinal Cord and ANS (Cramer and Darby 2005).

### 1.2.3 Organisation autonome parasympathique

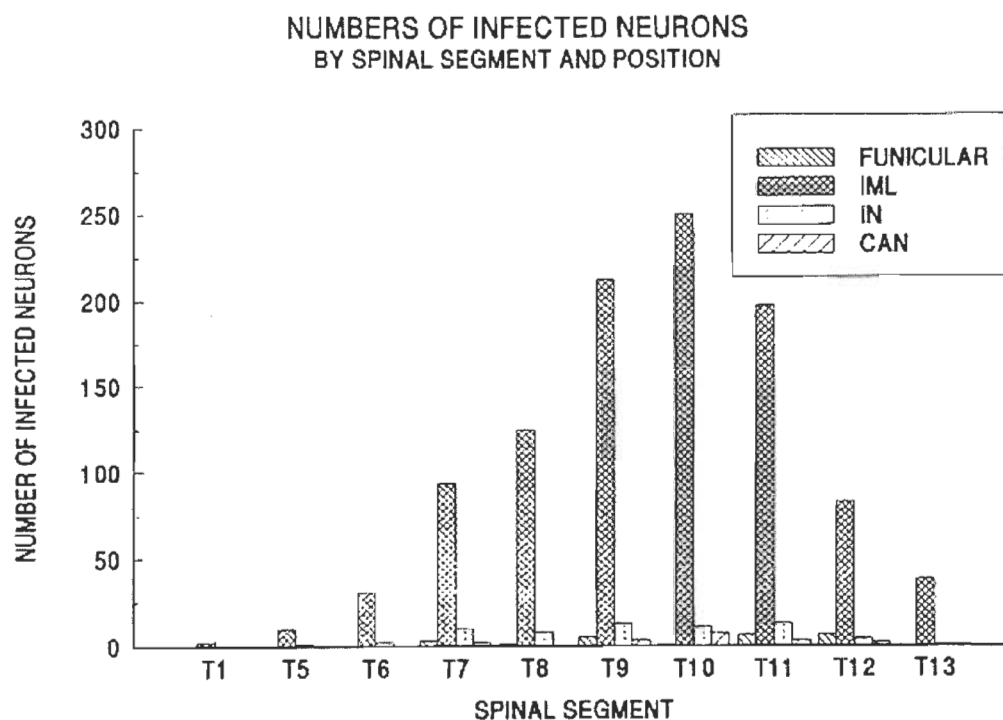
L'organisation parasympathique est très différente de la division sympathique. En premier lieu, les fibres préganglionnaires proviennent de neurones qui ne se trouvent que dans le tronc cérébral et la région sacrée de la moelle épinière (Purves et al. 2001). Au niveau du tronc cérébral, ces neurones parasympathiques comprennent le noyau d'Edinger-Westphal, les noyaux salivaires supérieur et inférieur, une portion du noyau ambigu et le noyau dorsal du nerf vague (X). Ils sont associés aux nerfs crâniens III, VII, IX, et X. Au niveau de la région sacrée, l'innervation préganglionnaire naît au sein de la substance grise latérale des segments sacrés S2 à S4 de la moelle. De plus, les ganglions prévertébraux reçoivent aussi des fibres parasympathiques préganglionnaires (Felten and Jozefowicz 2003). Une deuxième distinction de l'organisation parasympathique concerne l'emplacement des neurones postganglionnaires. Ceux-ci sont situés à l'intérieur ou à proximité des organes qu'ils contrôlent, au niveau des ganglions des nerfs crâniens dans la région de la tête (pour les nerfs III, VII et IX). Des ganglions intramuraux (pour les nerfs X et les segments sacrés) contenant aussi les neurones postganglionnaires parasympathiques sont retrouvés près de l'organe effecteur (Felten and Jozefowicz 2003).

### 1.2.4 Organisation sympathique rénale

Une particularité intéressante du rein est qu'il possède une innervation sympathique prédominante, et il existe peu d'évidences d'une innervation parasympathique (Robertson 2004). Pour ce qui est de l'innervation parasympathique, le traçage neuronal à partir des nerfs rénaux ne marque aucun noyau du nerf vague et les neurones préganglionnaires parasympathiques de la moelle sacrée projettent par les nerfs pelviens jusqu'aux neurones postganglionnaires des ganglions pelviens et intra-muraux du tractus urinaire (Jobling 2011). Les nerfs sympathiques rénaux jouent un rôle important dans une variété de réflexes rénaux et sont impliqués dans la

régulation physiologique de la circulation. La stimulation des nerfs sympathiques rénaux entraîne une diminution du débit sanguin rénal, ainsi que du taux de filtration glomérulaire (Robertson 2004). Chez le rat, la majorité des neurones préganglionnaires sympathiques rénaux se retrouvent au sein de la colonne intermédiolatérale, localisée entre les segments T5 et T13 de la moelle épinière, avec prédominance pour le segment T10 (Schramm et al. 1993). La figure 1.4 démontre la distribution de ces neurones.

Les axones de ces neurones se dirigent 3 ou 4 segments plus bas pour faire synapse avec les neurones postganglionnaires rénaux (T11-L3), qui sont regroupés au sein des ganglions coéliqués et de la chaîne ganglionnaire paravertébrale thoracique et lombaire, principalement au niveau de T13-L1 à gauche, et T12-T13 à droite (Jobling 2011; Ferguson et al. 1986; Schramm et al. 1993). De plus, les études anatomiques indiquent que l'innervation du rein provient de quelques contributions, du plexus coéliqué, des ganglions aortico-rénal et mésentériques (Strack et al. 1988; Barajas et al. 1992). La moelle allongée ventrolatérale rostrale envoie de nombreuses projections vers la colonne intermédiolatérale, de même que vers les cellules du groupe A5 de la région pontique, le noyau paraventriculaire hypothalamique et les noyaux du raphé médullaire caudal (Schramm et al. 1993). La moelle allongée ventrolatérale rostrale est très importante dans cette chaîne réflexe et dans la régulation homéostatique cardiovasculaire et pulmonaire (Janig 2006). Ainsi, les neurones de la moelle allongée ventrolatérale rostrale sont impliqués dans la régulation de la respiration, de la pression artérielle et du baroréflexe. Les projections de la moelle allongée ventrolatérale rostrale vers la colonne intermédiolatérale se font principalement par le faisceau dorsolatéral et le tractus réticulospinal (Janig 2006).



**Figure 1.4 :** Distribution longitudinale des neurones infectés par le rein (virus pseudo-rabique) au sein de la moelle épinière thoracique (le faisceau latéral (FUNICULAR), la colonne intermédiolatérale (IML), le noyau intercalé (IN) et le noyau autonome central (CAN)). Tiré de Schramm et al. (1993).

### 1.2.5 Modes de régulation du système nerveux autonome

La régulation du système nerveux autonome est régie par 2 sources de contrôle.

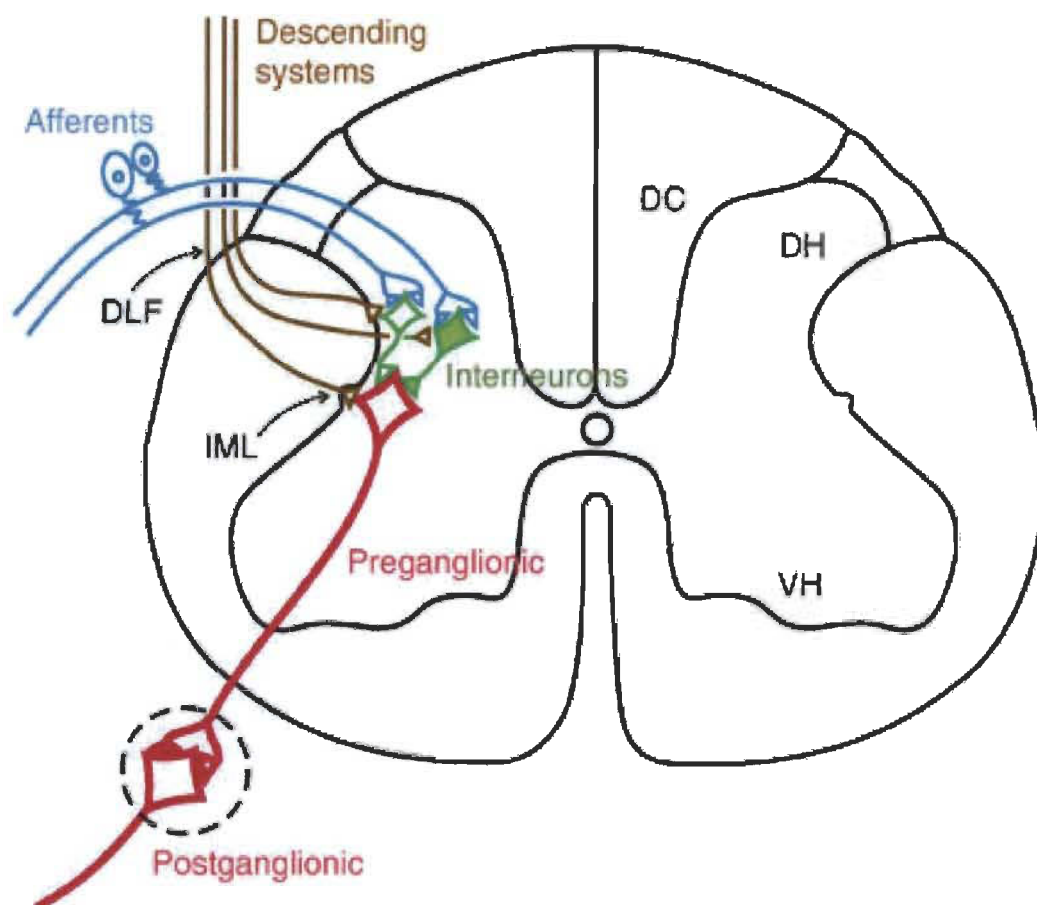
Premièrement, les fibres nerveuses autonomiques efférentes transmettent les commandes du système nerveux central en fonction du rythme circadien et de l'état de conscience (Sato et al. 1997; Rhudy et al. 2007; Valentini and Parati 2009). La deuxième source de contrôle des organes est par des réflexes induits par l'activation des récepteurs sensitifs périphériques, soit viscéraux, somatiques ou d'autres récepteurs crâniens spécifiques. La régulation réflexe des fonctions autonomiques via l'activité afférente somatique de la peau, des



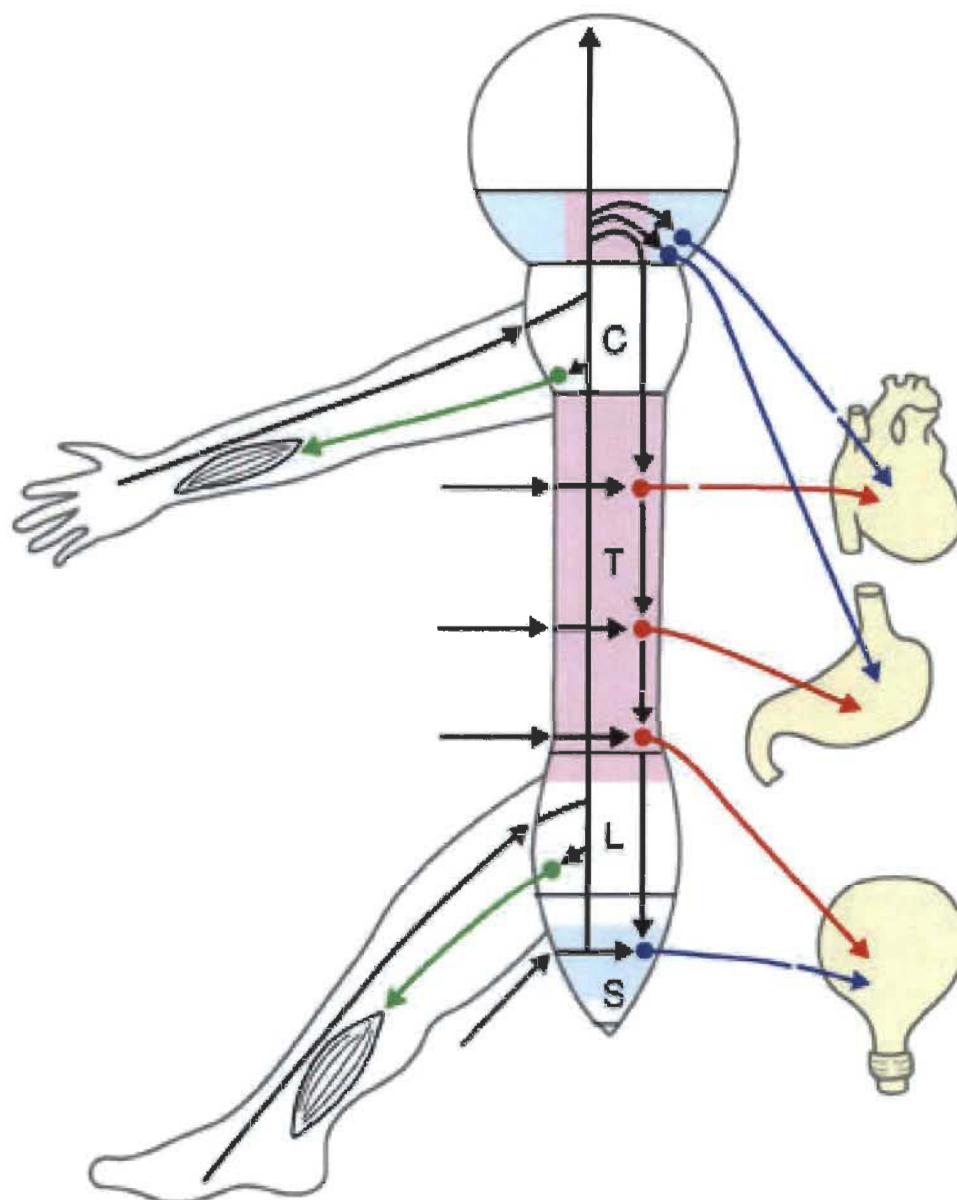
muscles, des tendons, des articulations et des autres tissus, est très bien documentée et ces réflexes sont appelés réflexes somato-autonomiques (Sato et al. 1997).

### **1.3 Réflexes somato-autonomiques**

La figure 1.5 montre les voies impliquées dans les réflexes spinaux alors que la figure 1.6 est une vue d'ensemble des réflexes somato-autonomiques, qui sont comparés au réflexes somato-somatiques. Cette figure met l'emphasis sur la différence entre les réflexes induits par une stimulation des membres comparativement à une stimulation du tronc. La figure 1.6 schématise les bases anatomiques de cette différence. Il est à noter que les réflexes somato-parasympathiques ne seront pas détaillés dans ce mémoire. Selon les régions stimulées, on peut s'attendre à des réponses réflexes différentes. Lorsque les afférences des membres sont stimulées, le réflexe sera supra-spinal, donc proviendra des structures cérébrales. À titre d'exemple, des stimulations appliquées sur le membre inférieur gauche, tel qu'à la figure 1.6, peuvent induire une réponse sympathique pour le cœur, l'estomac et la vessie, grâce à des réflexes supra-spinaux. Lorsque les afférences du tronc sont stimulées, on peut également induire des réflexes segmentaires en provenance de la moelle épinière. i.e. lorsque les afférences stimulées proviennent des mêmes segments de la moelle épinière que l'organisation sympathique préganglionnaire. Par exemple, lors d'une stimulation des afférences de la région de T10, on peut s'attendre à un réflexe segmentaire provenant des neurones préganglionnaires rénaux, et une réponse de l'organe cible.



**Figure 1.5 : Schématisation du réflexe somato-autonomique spinal.**  
Tiré de The Integrative action of the autonomic nervous system  
(Jänig 2006). La modulation descendante est aussi illustrée.

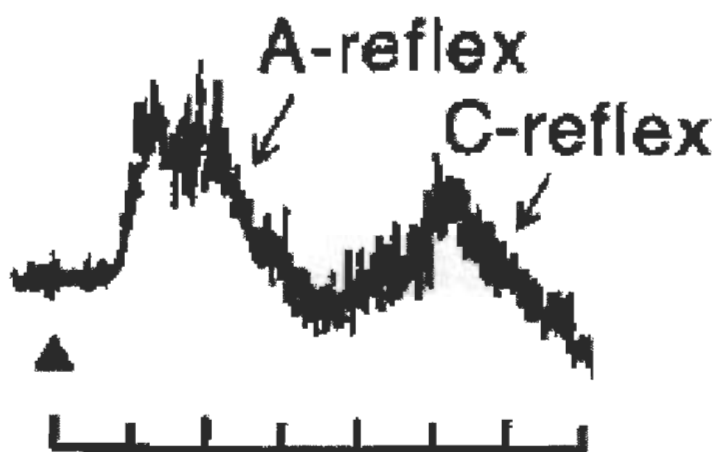


**Figure 1.6 : Voies des réponses réflexes somato-autonomiques et somato-somatiques.** On note un renflement cervical et lombaire au niveau de la moelle épinière où sont contenus les neurones moteurs somatiques. L'organisation sympathique est représentée en rose-rouge, alors que l'organisation parasympathique est représentée en bleu. La réponse somato-somatique est représentée en vert. (C : cervical, T : thoracique, L : lombaire, S : sacré.) Tiré de Sato et al. (1997).



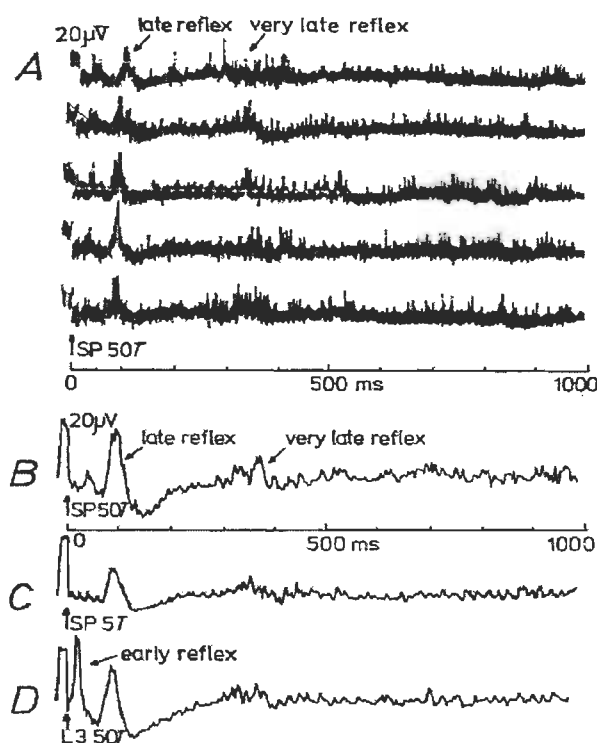
### 1.3.1 Réflexe somato-sympathique

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreuses études se sont penchées sur les caractéristiques des décharges réflexes sympathiques. Les réponses réflexes somato-sympathiques se divisent en deux composantes: 1) évoquées par des stimulations des afférences somatiques myélinisées i.e. le réflexe-A, et 2) évoquées par des stimulations des afférences somatiques non myélinisées i.e. le réflexe-C (Kimura et al. 1996; Sato et al. 1997). Des stimulations électriques des nerfs afférents somatiques à différentes intensités permettent d'identifier les 2 composantes du réflexe somato-sympathique. À une faible intensité, par exemple à une stimulation de 2 V, seul le réflexe-A est mis en évidence. À une forte intensité, comme à 20 V (figure 1.7), les 2 composantes du réflexe somato-sympathique : le réflexe A et C. Ces réponses distinctes sont mises en évidences grâce à la vitesse de conduction qui est différente pour chaque type de fibres, les réflexes se produisant donc à des latences différentes.



**Figure 1.7 : Schématisation du réflexe A et du réflexe C.** Exemple d'enregistrement des réponses réflexes sympathiques suite à des stimulations des afférences somatiques myélinisées (réflexe A) et non myélinisées (réflexe C). Le triangle noir représente le moment de la stimulation somatique électrique (20 V au nerf tibial). Tiré de Kimura et al. (1996).

Il existe deux composantes au réflexe A, illustrées à la figure 1.8; un premier réflexe spinal (« early spinal reflex ») et un second réflexe supraspinal (« late supraspinal reflex »). L'amplitude de la composante spinale est plus grande lorsque les afférences entrent au même segment (ou adjacent) du rameau communicant blanc de la moelle épinière où l'enregistrement du réflexe se fait. Quant à la composante supraspinale, elle est indépendante de l'endroit de la stimulation. Certains résultats rapportés montrent une 3<sup>e</sup> décharge réflexe faisant intervenir des voies suprapontiques, « very late suprapontine reflex », portant au nombre de trois les composantes du réflexe-A (Sato 1972). Pour ce qui est du réflexe-C, il est bien connu que la latence de celui-ci est plus grande en raison de la faible vélocité de conduction des afférences non myélinisées (Sato 1973).



**Figure 1.8 : Composantes du réflexe-A;** en A, l'activité sympathique enregistrée au niveau du rameau blanc lombaire suite à des stimulations des fibres myélinisées (nerf fibulaire superficiel (SP) et 3<sup>e</sup> nerf spinal lombaire (L3)). B-D, moyenne des essais et réponses à 50 fois l'intensité du seuil d'activation (B et D) et 5 fois l'intensité du seuil d'activation (C). Tiré de Sato (1972).

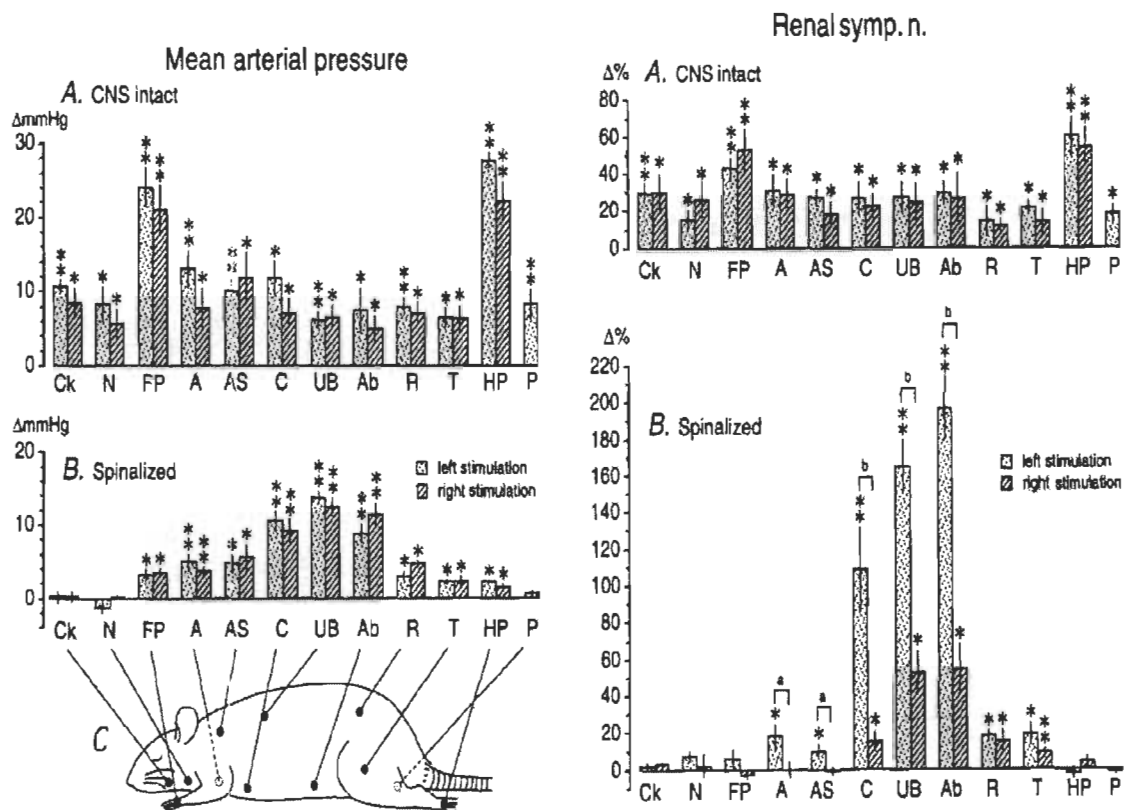
### 1.3.2 Réflexe somato-rénal

Les nerfs sympathiques rénaux se terminent au niveau du néphron, de l'appareil juxta-glomérulaire et de la vasculature environnante. L'activation de ces fibres à basse fréquence augmente la sécrétion de rénine et la réabsorption sodique tubulaire, alors qu'à haute fréquence, il y a une diminution du débit sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire (Davis and Johns 1995). L'activité sympathique rénale est sous le contrôle de réflexes supraspinaux (Davis and Johns 1995; Sato et al. 1997). Des stimulations d'afférences nerveuses périphériques peuvent évoquer des réflexes somato-sympathiques enregistrés au niveau des efférences du nerf sympathique rénal. Comme mentionné précédemment, ce réflexe est subdivisé en deux composantes : le réflexe-A relié à la transmission des fibres myélinisées de courte latence ( $41 \pm 2$  ms) et le réflexe-C relié à la transmission des fibres non myélinisées de longue latence ( $210 \pm 13$  ms) (Li et al. 2002). Le changement du débit sanguin d'un organe, tel le rein, en réponse à des stimulations somatiques douloureuses, est un réflexe somato-rénal et par conséquent un indicateur de l'activité sympathique du rein (Sato et al. 1997), mais ces changements peuvent être confondus avec les changements cardiovasculaires non spécifiques.

### 1.3.3 Modulation du réflexe somato-rénal

De manière générale, chez le rat anesthésié, avec système nerveux central intact ou avec moelle épinière spinalisée à C2, les fonctions cardiovasculaires peuvent être modulées par des stimulations mécaniques nociceptives de la peau (Kimura et al. 1995). Les afférences somatiques faisant synapse dans les segments thoraciques sont particulièrement efficaces pour produire des réponses des nerfs sympathiques rénaux et cardiaques (Kimura et al. 1995). Ainsi, chez le rat intact, des stimulations somatiques cutanées induites par pincement de la peau produisent une augmentation de l'activité du nerf sympathique rénal et de la pression artérielle moyenne, indépendamment de la

latéralité. Les stimulations des pattes produisent des réponses de plus forte amplitude. Chez le rat spinalisé, seulement les stimulations segmentaires produisent une élévation de l'activité du nerf sympathique rénal, suggérant l'existence de 2 types de réponses i.e. supraspinales (organisation réflexe diffuse) et propriospinales (organisation segmentaire) (Kimura et al. 1995; Sato et al. 1997). La figure 1.9 illustre les changements de pression artérielle moyenne et du nerf sympathique rénal gauche suite à des stimulations somatiques. Les résultats de différentes études suggèrent que les réponses cardiovasculaires induites par des stimulations somatiques sont conséquentes aux réponses réflexes sympathiques cardiovasculaires et que celles-ci semblent démontrer une forte organisation segmentaire spinale ainsi qu'une composante supraspinale (Kimura et al. 1995; Kimura et al. 1996; Sato et al. 1997). Des stimulations électriques des nerfs somatiques afférents de la peau et des muscles ont aussi pour effet d'augmenter l'activité sympathique rénale, le pouls et la pression artérielle (Coote 1975). D'autre part, des stimulations de type acupuncture appliquées de manière segmentaire peuvent moduler les réflexes somato-rénaux A et C (Li et al. 2002). D'autres études réalisées chez l'animal ont démontré une modulation de l'activité du nerf rénal et de la pression artérielle suite à des stimulations nociceptives thermiques, mécaniques et électriques au niveau de la région oro-faciale (Terui et al. 1981). Toujours chez l'animal, des stimulations cutanées mécaniques nociceptives ont démontré une excitation de l'activité sympathique rénale (enregistrement unitaire rénal) ainsi que des variations dans la pression artérielle (Dorward et al. 1987).



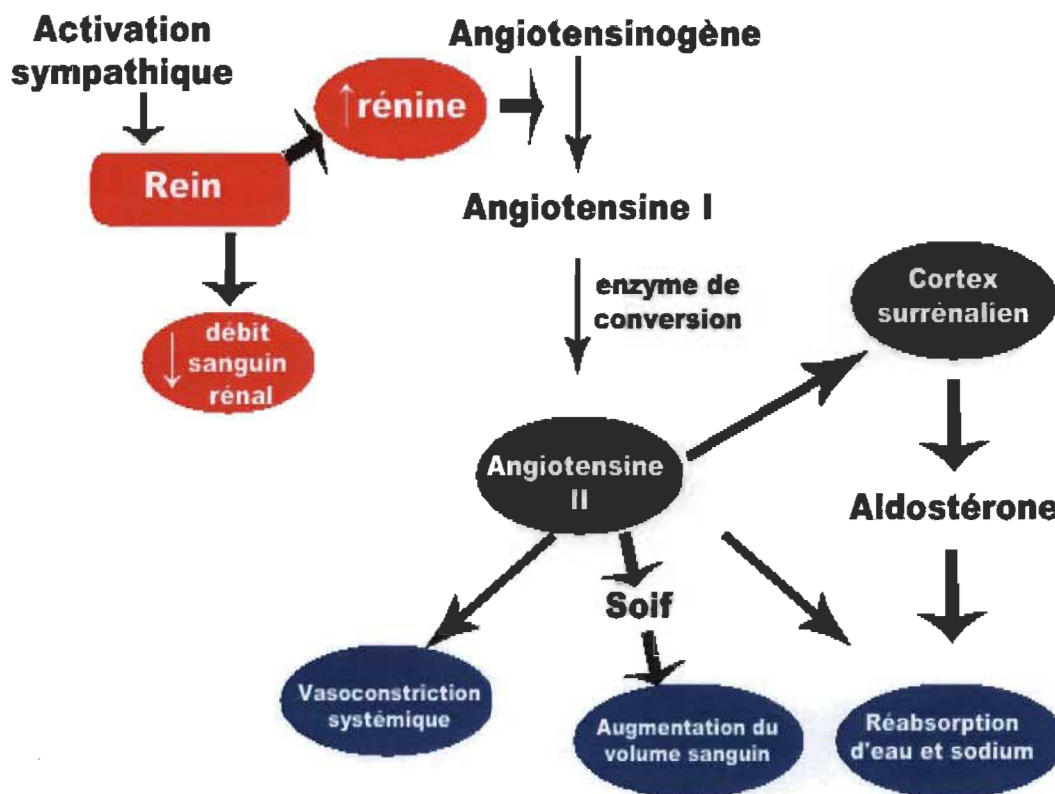
**Figure 1.9 : Réponses de la pression artérielle moyenne et du nerf sympathique rénal gauche suite à des stimulations somatiques (pincement au niveau de la peau).** (Ck, mâchoire; N, cou; FP, patte antérieure; A, bras; AS, région de la scapula; C, thorax; UB, haut du dos; Ab, abdomen; R, flanc; T, cuisse; HP, patte postérieure; P, periné.) Tiré de Kimura et al. (1995).

#### 1.4 Fonctions de l'innervation sympathique rénale

Les neurones sympathiques efférents du néphron affectent la réabsorption tubulaire de sodium, la sécrétion de rénine et le débit sanguin rénal. Suite à une activation sympathique, les cellules juxtaglomérulaires de l'artériole sécrètent une enzyme appelée rénine qui joue un rôle important dans la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien. L'aldostérone entraîne conséquemment une réabsorption de sodium et d'eau (Pocock and Richards 2004). La rénine convertit aussi une protéine plasmatique produite par le foie, l'angiotensinogène, en angiotensine I. Le sang circulant ensuite dans les capillaires du poumon

permet à l'enzyme de conversion de l'angiotensine de transformer l'angiotensine I en une hormone, l'angiotensine II. L'angiotensine II a un effet vasoconstricteur sur les artérioles rénales efférentes et afférentes (Tortora and Grabowski 2001). Suite à une activation sympathique, on observe aussi une diminution du débit sanguin rénal (Pocock and Richards 2004 ; Goldsmith et al. 2010). L'innervation sympathique permet un contrôle extrinsèque de la circulation rénale qui peut dépasser l'autorégulation intrinsèque. Ainsi, la diminution de débit sanguin rénal est un bon indicateur de l'activité sympathique rénale. Ces changements sont plus faciles à identifier comparativement aux changements cardio-vasculaires simultanés d'origine sympathique, se traduisant par des augmentations par exemple de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Robertson 2004). La figure 1.10 schématise les changements rénaux et systémiques suite à une activation sympathique. Une activité inappropriée et excessive du système nerveux sympathique contribue au développement de pathologies telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque congestive et le syndrome cardio-rénal (Lohmeier 2001; Shlipak and Massie 2004). L'importance de l'innervation sympathique rénale dans l'hypertension a bien été démontrée par la sympathectomie lombaire comme approche efficace dans le traitement de l'hypertension (Lohmeier 2001; Katholi and Rocha-Singh 2009). La dénervation sympathique rénale se veut une technique élégante et efficace dans les cas d'hypertension résistants à la pharmacologie, en diminuant la pression artérielle de manière significative et augmentant aussi l'espérance de vie chez ces patients (Doumas et al. 2011).





**Figure 1.10 : Impacts systémiques de l'activation sympathique rénale.**  
 Cette figure schématise la réponse rénale et systémique suite à une activation sympathique.

### 1.5 Influences du système cardiovasculaire

Les réponses du système nerveux autonome suite à des stimulations afférentes somatiques varient selon le type de stimulus e.g. nociceptif ou non-nociceptif (Sato et al. 1997). Une stimulation nociceptive induit une augmentation de la pression artérielle systémique, ayant aussi pour effet d'augmenter le débit sanguin régional des différents systèmes et organes. La réponse sympathique peut donc être masquée par cette réponse réflexe artérielle, aussi connue sous le nom de réponse vasopressive réflexe (« pressor reflex response ») (Noguchi et al. 1999). Par contre, au niveau rénal, ces augmentations de pression artérielle d'origine sympathique sont plus facilement identifiables que la réponse sympathique rénale, se traduisant par des diminutions du débit sanguin rénal. La réponse d'élévation de la pression

artérielle suite à des stimulations nociceptives cutanées est associée de près à l'activité sympathique du nerf rénal (Dorward et al. 1987). Plusieurs évidences pointent vers le fait que la réponse vasopressive réflexe aux stimulations afférentes somatiques proviendrait du noyau réticulaire de la médulla ventrolatérale rostrale. Les afférences somatiques empruntent les fibres spinoréticulaires contralatérales et entrent dans l'aire adrénergique C1 de la moelle allongée ventrolatérale rostrale ce qui entraîne la réponse vasopressive (« pressor ») (Stornetta et al. 1989). Chez le rat dont le système nerveux central est intact, une forte influence inhibitrice de la réponse supraspinale est observée via le faisceau ipsilatéral, le quadrant ventral de la moelle épinière, la moelle allongée ventrolatérale rostrale bilatéralement et les aires noradrénergiques du tronc cérébral (A1-A5).

## **1.6 Hormones du stress et douleur chronique**

Les glandes surrénales constituent fonctionnellement deux glandes fonctionnelles en une seule. À l'interne, la médullosurrénale sécrète les catécholamines, adrénaline et noradrénaline, en réponse à l'activation sympathique. À l'externe, la corticosurrénale sécrète les différentes hormones stéroïdiennes : les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes (principalement la déhydroépiandrostérone). Les glucocorticoïdes comprennent le cortisol, la corticostérone et la cortisone (Pocock and Richards 2004). De ces 3 hormones, le cortisol est le plus abondant des glucocorticostéroïdes et jouent un rôle crucial dans la réponse de l'organisme au stress. Ces hormones ont principalement pour effet d'accélérer la dégradation des protéines, d'augmenter la néoglucogenèse, de stimuler la lipolyse, de supprimer la réponse immunitaire en plus d'avoir des effets anti-inflammatoires. Les glucocorticoïdes favorisent aussi la résistance au stress, notamment en rendant les vaisseaux plus sensibles aux médiateurs qui causent la vasoconstriction (Tortora and Grabowski 2001). Lors d'une douleur aiguë, il y a une activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-glandes surrénales entraînant une augmentation de la



sécrétion de cortisol. Lors de douleurs chroniques, on révèle cependant un état d'hypocortisolémie (McEwen and Kalia 2010). Chez le rat, il a été démontré que les hormones sécrétées par les glandes surrénales n'étaient pas responsables des changements somatocardiovasculaires, puisque les réponses étaient conservées lors de surrénalectomie bilatérale (Sato et al. 1976). De plus, l'utilisation d'animaux anesthésiés élimine les facteurs émotionnels associés au stress et les variations hormonales associées.

## **1.7 Nociception et système nerveux autonome**

Sachant que la régulation du système nerveux autonome peut être influencée par des récepteurs sensitifs périphériques, voyons maintenant la description de certains de ces récepteurs, soit les nocicepteurs, et leur importance dans la modulation autonome par des stimuli nociceptifs.

### **1.7.1 Les nocicepteurs**

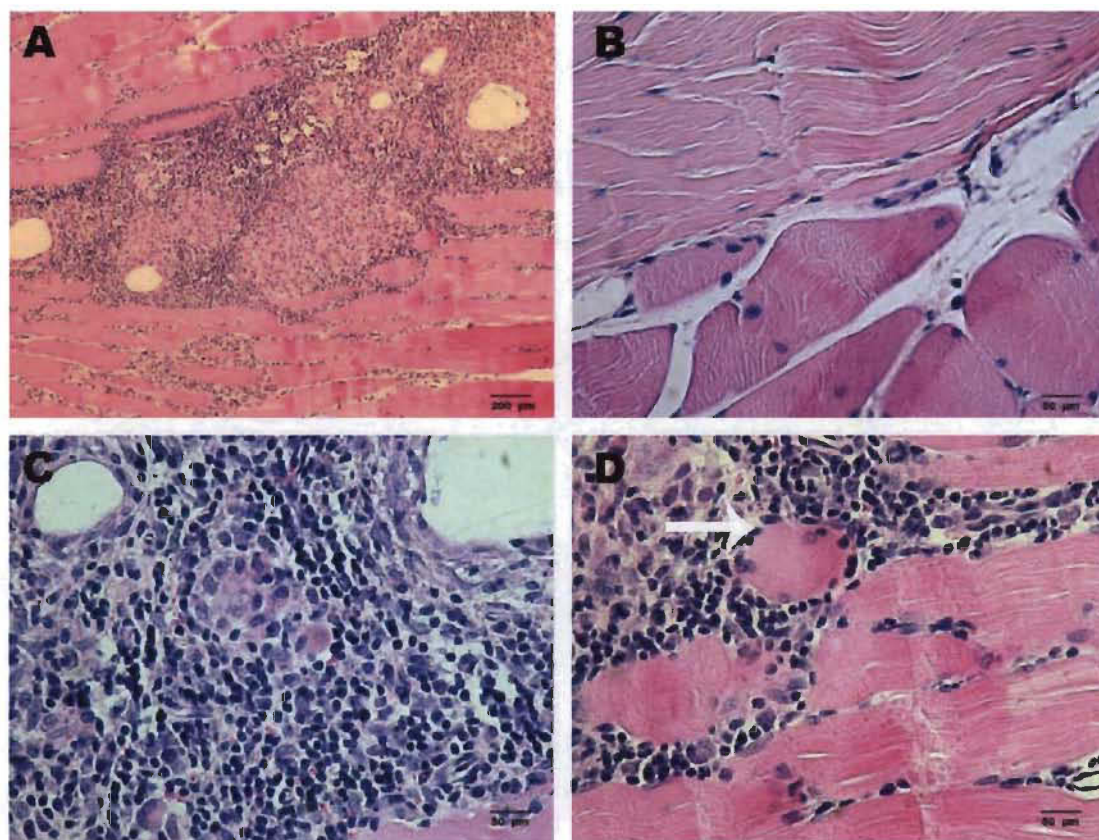
Selon l'*International Association for the study of Pain (IASP)*, les nocicepteurs sont les récepteurs sensitifs à haut seuil d'activation du système nerveux périphérique somatosensoriel qui sont capables de coder et de faire la transduction des stimuli nociceptifs. Toujours selon l'IASP, la nociception est l'activation chimio-électrique des récepteurs et fibres périphériques par des stimuli dommageables pour les tissus, ou qui deviendraient dommageables s'ils perduraient, et la transmission vers le cerveau des potentiels d'action associés. D'un point de vue morphologique, les nocicepteurs sont tous des terminaisons nerveuses libres. Ces terminaisons contiennent divers récepteurs moléculaires qui lorsqu'activés, excitent ou sensibilisent le nocicepteur. La grande variabilité inter-espèce des nocicepteurs entraîne beaucoup de confusion quant à leurs classifications. La classification la plus fréquente étant celle divisant les nocicepteurs en nocicepteurs mécaniques, polymodaux et thermiques (Sato et al. 1997). Au niveau musculaire plus spécifiquement, on distingue trois types de

nocicepteurs, soit les nocicepteurs sensibles aux stimuli mécaniques, les chimionocicepteurs qui répondent aux agents algésiques, tels que ceux utilisés dans le cadre des travaux de ce mémoire, et les nocicepteurs polymodaux, qui sont activés par les substances chimiques et qui sont sensibles à l'étirement de grande amplitude (Djoughri and Lawson 2004). Les chimionocicepteurs transmettent leur activité afférente via les fibres du groupe IV (Graven-Nielsen et al. 2008). Parmi les mécanonocicepteurs, on note les récepteurs HTM (high-threshold mechanosensitive) ayant un haut seuil d'activation à la pression locale potentiellement dommageable seulement empruntant les fibres afférentes du groupe III et IV (Graven-Nielsen et al. 2008). Plus l'intensité de la stimulation mécanique augmente, plus la réponse des mécanonocicepteurs augmente (Chaouch and Besson 1986). Cependant, ces unités ne démontrent pas d'activité spontanée et s'adaptent lentement à des stimuli prolongés (Sato et al. 1997). En ce qui a trait aux nocicepteurs polymodaux, ils répondent à tous les types de stimulations nociceptives : mécaniques, thermiques et chimiques. Les nocicepteurs polymodaux empruntent aussi les fibres afférentes du groupe IV (Graven-Nielsen et al. 2008). Pour ce qui est des nocicepteurs thermiques, de rares nocicepteurs cutanés répondent à la chaleur avec des seuils d'activation s'échelonnant entre 45-48 °C. Ces unités ne répondent à aucune stimulation mécanique (Schmidt et al. 1995). On rapporte aussi des nocicepteurs activés par de très faibles températures (Graven-Nielsen et al. 2008).

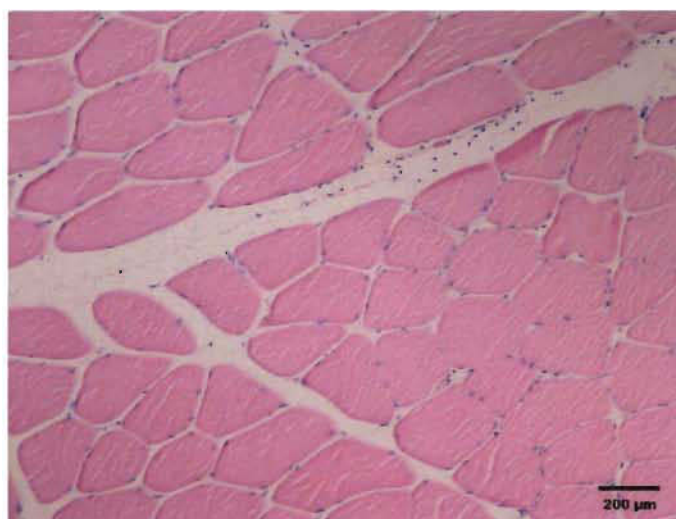
### **1.7.2 Effets de la myosite**

Dans le cas d'altérations pathophysiologiques tissulaires comme une inflammation, on observe un phénomène de sensibilisation des nocicepteurs correspondant à une diminution du seuil d'activation des récepteurs. Le stimulus peut donc engendrer l'excitation du nocicepteur (Sato et al. 1997). L'inflammation du muscle, ou myosite, produit des signes typiques de sensibilisation des nocicepteurs. De faibles stimulations mécaniques entraînent une décharge des nocicepteurs et causent des douleurs spontanées (Diehl et al.

1988). Il a été démontré qu'il était possible d'induire une inflammation musculaire locale et chronique chez un modèle animal de douleur chronique, provoquée par l'injection d'adjuvant complet de Freund (CFA) au niveau du muscle triceps sural. Cette inflammation musculaire est marquée par une infiltration leucocytaire, principalement constituée par des monocytes et cellules lymphoïdes (Chacur et al. 2009). L'inflammation du muscle, ou myosite, ainsi que les blessures musculaires, démontrent des signes tissulaires pathologiques caractéristiques qui sont illustrés à la figure 1.11, alors que la figure 1.12 illustre un muscle à l'état normal (Damjanov and Linder 1996). Tout d'abord, on note la présence d'une réaction interstitielle due à l'infiltrat inflammatoire, avec la présence de leucocytes, principalement des monocytes et cellules lymphoïdes (figure 1.12A et 1.12C). Un autre signe tissulaire caractéristique est un changement du volume de la fibre, témoignant généralement d'une atrophie (figure 1.12B). On remarque aussi une réaction des noyaux avec une migration centripète, qui apparaissent aussi pyknotiques. Puis, comme dans la majorité des myopathies inflammatoires, on note une dégénérescence des fibres. Une régénération subséquente des fibres est observée ainsi que la présence de myoblastes (figure 1.12D).



**Figure 1.11 : Histologie d'un muscle à l'état inflammatoire (A-D).** En A, on note la présence d'un infiltrat leucocytaire. En B, l'atrophie des fibres musculaires. En C, la présence de macrophages et lymphocytes. En D, la présence de régénération des fibres et d'un myoblaste (indiqué par une flèche).



**Figure 1.12 : Histologie d'un muscle à l'état normal.**



### 1.7.3 Rôle des cytokines sur la chronicisation de la douleur

Les cytokines sont des peptides extracellulaires qui sont connus depuis longtemps pour leur rôle dans les réponses immunitaires et les processus inflammatoires (Graven-Nielsen et al. 2008). Dans une condition inflammatoire telle que la myosite, on note une augmentation importante de la production de cytokines, principalement les cytokines interleukines-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et les cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Les IL-1 $\beta$  dérivent des macrophages, agissent localement et sont capables de diminuer le seuil d'activation des nocicepteurs dans les tissus périphériques (Fukuoka et al. 1994). Les TNF- $\alpha$  sont quant à elles produites par des macrophages et monocytes, en plus d'avoir une activité similaire aux IL-1 $\beta$ . De manière générale, on note une augmentation de l'activité inflammatoire lors d'un déséquilibre entre les cytokines anti-inflammatoires et les cytokines pro-inflammatoires, soit les IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ . Les nocicepteurs périphériques sont activés directement par les IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs spécifiques (Graven-Nielsen et al. 2008). Suite à cette activation répétée, il y a relâche de neuropeptides tels que la substance P et peptide lié au gène de la calcitonine. Ces médiateurs amplifient la sensibilisation des nocicepteurs, entraînant la chronicité des processus inflammatoires. Les cytokines anti-inflammatoires méritent aussi d'être citées. Les interleukines-4, interleukines-10 et interleukines-13 sont anti-inflammatoires et sont reconnues pour diminuer la douleur (Hao et al. 2006; Graven-Nielsen et al. 2008). Parmi les interleukines pro-inflammatoires, on note aussi l'interleukine-6, qui est impliquée dans la douleur, la dégradation des os et du cartilage, et dont la production par les monocytes et macrophages est influencée par les IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Watkins et al. 1995). Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires sont particulièrement impliquées dans la sensibilisation des nocicepteurs ainsi que la perpétuation de l'inflammation musculaire et de la douleur.

#### **1.7.4 Modulation autonome par des stimuli nociceptifs et non nociceptifs**

De façon générale, les stimulations nociceptives ont un effet facilitateur sur les réflexes sympathiques alors que les stimulations non nociceptives ont un effet inhibiteur (Sato et al. 1997). Par exemple, une stimulation nociceptive des tissus vertébraux produit une facilitation sympathique associée à une inhibition de la motilité gastrique (Budgell and Suzuki 2000). Des stimulations chimiques nociceptives des tissus interépineux chez le rat sont bien connues pour influencer les réponses autonomiques et la fonction de certains organes e.g. au niveau de la motilité gastrique, de la motilité vésicale et de la fonction surrénalienne (Sato et al. 1975; Budgell et al. 1997; Budgell et al. 1998; Budgell and Suzuki 2000). Ces stimulations chimiques nociceptives par injection de capsaïcine, un algésique ayant le potentiel de simuler une inflammation locale aiguë, ont une forte affinité pour les récepteurs polymodaux (Budgell et al. 1997). Plus spécifiquement, la capsaïcine excite fortement les fibres du groupe III et IV innervant les muscles squelettiques et l'on présume que l'ensemble de ces mécanismes se fait par l'activation du récepteur TRPV1 (« transient receptor potential vanilloid 1 ») (Graven-Nielsen et al. 2008). Des changements de la motilité gastrique ont aussi pu être observés suite à des stimulations cutanées mécaniques nociceptives au niveau du tronc chez le rat (Sato et al. 1975).

Les stimulations non nociceptives ont un effet inhibiteur sur les réflexes sympathiques. À titre d'exemple, une stimulation mécanique non nociceptive du rachis produit une diminution du taux de décharge des neurones sympathiques du nerf rénal et de la tension artérielle (Sato and Swenson 1984).

Par ailleurs, il existe des différences entre la stimulation des tissus cutanés et des tissus profonds, qui peuvent avoir des effets opposés malgré qu'elles soient toutes deux produites par des afférences nociceptives. Cette divergence implique notamment les neurones cutanés vasoconstricteurs (Janig 2006). Une

stimulation nociceptive cutanée produira donc une inhibition alors que la stimulation des tissus profonds produira une facilitation. Il est à noter que ces voies sont complexes et sont sous le contrôle de la moelle allongée et de l'hypothalamus (Janig 2006).

### **1.7.5 Spécificité des stimulations thoraciques**

La spécificité des stimulations thoraciques est telle qu'une stimulation des tissus du tronc peut également induire des réflexes segmentaires en provenance de la moelle épinière. Comme mentionnée précédemment, une stimulation nociceptive des tissus vertébraux produit une facilitation sympathique (Budgell and Suzuki 2000). De plus, ces effets dépendent en partie de réflexes segmentaires, même chez les animaux sans section spinale.

Ces études démontrent clairement que la fonction des organes peut être influencée par des stimulations des tissus vertébraux. Cependant, ces résultats sont limités aux stimuli aigus et peu d'évidences sont disponibles quant à la modulation des réflexes sympathiques par des afférences de la région thoracique (Sato et al. 1997; Budgell and Suzuki 2000; Pickar 2002). L'étude des effets segmentaires facilitateurs de la douleur vertébrale chronique sur les fonctions autonomiques a quant à elle été négligée. La modulation de ces effets facilitateurs par d'autres stimuli des mêmes tissus n'est pas non plus documentée.

## **1.8 Objectifs de la recherche**

Dans cette étude, nous avons tenté de déterminer l'effet de stimulations nociceptives aiguës et chroniques sur les réponses sympathiques.

### **1.8.1 Objectifs spécifiques**

Le premier objectif de ce projet est de mettre au point un modèle animal de douleur vertébrale chronique. Le deuxième objectif est de déterminer si la douleur vertébrale chronique peut altérer les changements de débit sanguin rénal induits par une stimulation électrique nociceptive de la patte postérieure. Le troisième objectif du projet est de caractériser l'effet d'une stimulation nociceptive aiguë des muscles paravertébraux, en injectant une solution saline hypertonique à 6 % au niveau de la région de T2 et T10, sur les réponses sympathiques de changements du débit sanguin rénal, chez des rats sains et des rats avec douleur chronique. Avant de réaliser ces objectifs, nous avons émis l'hypothèse suivante :

Se rapportant aux objectifs 2 et 3, les changements de débit sanguin rénal seront augmentés chez les rats avec douleur chronique à T10 (niveau sympathique rénal), comparativement aux rats contrôles et aux rats avec douleur chronique à T2.

### **1.8.2 Importance et originalité de la recherche**

Ce projet permettra de documenter les effets néfastes de la douleur vertébrale chronique sur les fonctions rénales. Enfin, cela permettra peut-être une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques de désordres autonomiques chroniques e.g. l'hypertension, le syndrome de douleur régionale complexe de type I et les syndromes de douleurs chroniques, car les mécanismes spinaux exercent une forte influence modulateur au niveau du développement et de la perpétuation de ces pathologies (Hooshmand 1993). De façon plus générale, ces expériences permettront d'approfondir les connaissances sur les interactions somato-autonomiques, qui ne sont décrites jusqu'à maintenant que pour des stimuli aigus.



## **CHAPITRE II**

### **CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES**

Les procédures expérimentales du chapitre III décrivent notre méthodologie de façon exhaustive, mais nous apportons ici quelques précisions sur les techniques utilisées et le modèle de douleur chronique vertébrale que nous avons mis au point.

#### **2.1 Anesthésie à l'uréthane**

Préalablement aux procédures chirurgicales, tous les rats ont été anesthésiés à l'uréthane (1.2 g/kg i.p.). L'anesthésie à l'uréthane est largement utilisée dans l'étude du système nerveux autonome chez l'animal, puisqu'elle préserve les réflexes sympathiques (Maggi and Meli 1986). L'uréthane a comme principale caractéristique d'induire une anesthésie sans affecter la neurotransmission dans les diverses aires sous-corticales, ainsi que dans le système nerveux périphérique (Maggi and Meli 1986). L'uréthane préserve donc les réponses réflexes, permettant une anesthésie stable de longue durée, et constitue un anesthésiant bien adapté aux diverses études sur le système nerveux (Maggi and Meli 1986).

#### **2.2 Induction de la myosite**

Les animaux du groupe chronique recevaient une injection i.m. de 150  $\mu$ L d'adjuvant complet de Freund (CFA) (Difco Lab., Detroit, MI, USA) dans les muscles paravertébraux. Cette injection cause une myosite et une sensibilisation centrale en 12 jours (Chacur et al. 2009).

### **2.3 Fixation et prélèvements des muscles**

Suite à l'expérimentation, les animaux étaient perfusés suivant la méthode de perfusion intracardiaque par gravitation à la formaline (10 %) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Les muscles prélevés étaient maintenus dans la formaline (10 %) de 24 à 48 heures et ensuite préservés dans l'eau déminéralisée.

### **2.4 Circulation universelle**

Suite à la fixation, les tissus étaient mis dans des cassettes (one-piece tissue cassettes, Surgipath, Winnipeg, Manitoba, Canada). Les cassettes étaient alors déposées dans le circulateur automatique (Tissue Tek VIP E300 tissue processor, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Les produits utilisés étaient le Formol (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), l'alcool (Flex 100, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA), le xylène (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) et la paraffine (Surgipath, Winnipeg, Manitoba, Canada).

### **2.5 Inclusion à la paraffine et coupe au microtome**

Les prélèvements ont été réinclus dans des cassettes adaptées pour la coupe au microtome (Reichert Histostat microtome model 820, Reichert Technologies, Depew, NY, USA). Les coupes de cinq micromètres (5 µm) ont été réalisées et stockées dans des boîtes d'histologie.

### **2.6 Coloration des tissus**

Une coloration de routine trichromique à l'hématoxyline de Harris, l'érythrosine et au safran (H.E.S) a été réalisée, mettant en évidence les structures nucléaires en bleus violets, le cytoplasme en roses et le collagène du

tissu conjonctif en jaune-orange. La coloration a été effectuée à l'aide d'un appareil automatique pour la coloration (Autostainer XL, Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne).

**Tableau 2.1**

Procédure de coloration des tissus

ÉTAPE	ACTION
1.	Xylène : <u>4 min</u>
2.	Xylène : <u>3 min</u>
3.	Xylène : <u>3 min</u>
4.	Alcool 100 % : <u>4 min</u>
5.	Alcool 100 % : <u>4 min</u>
6.	Alcool 95 % : <u>4 min</u>
7.	Alcool 80 % : <u>4 min</u>
8.	Alcool 70 % : <u>4 min</u>
9.	Eau courante : <u>5 min</u>
10.	Hematoxyline de Harris : <u>3 min</u>
11.	Eau courante : <u>1 min</u>
12.	Ammoniaque : <u>25 sec</u>
13.	Eau courante : <u>5 min</u>
14.	Érythrosine : <u>4 min</u>
15.	Eau courante : <u>5 min</u>
16.	Rincer à l'alcool 100 %
17.	Safran : <u>4 min</u>
18.	Déshydrater
19.	Éclaircir
20.	Monter

## CHAPITRE III

### ARTICLE

Plasticity of somato-renal reflexes in a rat model of chronic spinal pain.

Sébastien Houle<sup>1-3</sup>, Harumi Hotta<sup>4</sup>, Sae Uchida<sup>4</sup>, Renaud Jeffrey-Gauthier<sup>1-3</sup>, Djamel Ramla<sup>1</sup> and Mathieu Piché<sup>1-3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chiropractic, <sup>2</sup>Groupe de Recherche en Neurosciences, <sup>3</sup>Groupe de Recherche sur les Affections Neuromusculosquelettiques, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada, <sup>4</sup>Department of Autonomic Neuroscience, Tokyo Metropolitan Hospital and Institute of Gerontology, Tokyo, Japan.

**\*Corresponding author:**

Mathieu Piché, DC, PhD  
Department of Chiropractic  
Université du Québec à Trois-Rivières  
3351 boul. des Forges, C.P. 500  
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7  
Telephone: 819-376-5011 Extension 3998  
Fax: 819-376-5204  
E-mail: [Mathieu.Piché@uqtr.ca](mailto:Mathieu.Piché@uqtr.ca)

### 3.1 Contribution des co-auteurs de l'article

Le paradigme expérimental a été conçu par Mathieu Piché, Harumi Hotta et Sae Uchida. Les expériences ont été réalisées par Sébastien Houle, Mathieu Piché et Renaud Jeffrey-Gauthier. L'histopathologie a été réalisée par Djamel Ramla avec l'aide de Sébastien Houle et de Mathieu Piché. L'article a été rédigé par Sébastien Houle et Mathieu Piché.

### 3.2 Résumé

Chez l'animal, des stimulations appliquées sur les membres peuvent induire des réflexes sympathiques d'origine cérébrale. En plus de ces réflexes d'origine cérébrale, une stimulation des tissus du tronc peut également induire des réflexes segmentaires en provenance de la moelle épinière. Cependant, les effets néfastes de la douleur vertébrale chronique sur le système nerveux autonome et la fonction de certains organes n'ont jamais été documentés. Dans le présent projet, nous avons spécifiquement examiné si la douleur thoracique chronique pouvait altérer la régulation du débit sanguin rénal. Chez des rats Wistars anesthésiés à l'uréthane, les changements du débit sanguin rénal ont été induits par une stimulation électrique de la patte postérieure gauche ou par des injections de saline hypertonique dans les muscles paravertébraux de T2 ou T10. Pour déterminer l'effet de la douleur vertébrale chronique, l'amplitude des changements du débit sanguin rénal a été comparée chez 3 groupes, un groupe contrôle, qui recevait une injection de solution saline (150  $\mu$ L i.m.), et 2 groupes avec douleur chronique, qui recevait une injection de CFA (150  $\mu$ L i.m.), l'un dans les muscles paravertébraux de T10, et l'autre dans les muscles paravertébraux de T2. Tous les rats étaient injectés 12 jours avant le jour de l'expérience. La douleur chronique à T2 a induit une atténuation significative du changement de débit sanguin rénal évoqué par les chocs et une augmentation significative du seuil de réponse ( $p=0.047$  et  $p=0.01$ , respectivement). Étonnamment, ces changements étaient attendus pour le groupe avec une douleur vertébrale à T10, dont les afférences nociceptives font synapse dans les segments médullaires contenant les neurones sympathiques préganglionnaires. De plus, les injections de saline hypertonique dans les muscles thoraciques paravertébraux ont induit des changements de débit sanguin rénal plus importants lorsque les injections étaient à T10 ( $p=0.047$ ) comparativement à T2. Cependant, l'inflammation chronique n'a pas altéré ces changements. Ces résultats indiquent que l'inflammation vertébrale chronique peut altérer la régulation du débit sanguin rénal. Des études ultérieures permettront de déterminer les mécanismes de ces changements.

### 3.3 Article scientifique

Plasticity of somato-renal reflexes in a rat model of chronic spinal pain.

#### ABSTRACT

In animals, acute stimulation of the limbs can evoke sympathetic reflexes from cerebral origin. In addition, spinally-mediated reflexes can also be elicited when stimulation is applied to somatic tissues of the trunk. It is still unknown however, whether chronic spinal pain may alter these reflexes. In the present study, alterations of renal blood flow (RBF) regulation by chronic thoracic pain was examined using laser Doppler flowmetry. In urethane anesthetized Wistar rats, RBF changes were evoked by electrical stimulation of the left hindpaw or by hypertonic saline injections in paravertebral muscles of T2 or T10. To determine the effect of chronic vertebral pain, the amplitude of RBF changes was compared across three groups, 12 days after an intramuscular injection in paravertebral muscles. The control group received a physiological saline injection (150  $\mu$ L i.m.) at T10 and the two chronic pain groups received a Complete Freund adjuvant injection (150  $\mu$ L i.m.), either at T2 or T10. Chronic spinal pain at T2 induced a significant attenuation of shock-evoked RBF changes and a significantly higher response threshold ( $p=0.047$  and  $p=0.01$ , respectively). Similar changes of smaller amplitude were observed for rats with chronic spinal pain at T10, but these changes were not statistically significant ( $p>0.05$ ). In contrast, hypertonic saline injection in thoracic paraspinal muscles induced robust RBF changes but these changes were not significantly different between groups. These results indicate that chronic vertebral inflammation can alter somato-renal reflexes, especially when reflexes are evoked by stimulation of the hind limb.

**Running title:** Plasticity of somato-renal reflexes

**Key words:** Pain, somato-autonomic reflexes, sympathetic, spinal, renal blood flow, plasticity

## INTRODUCTION

Over the past 40 years, studies on somato-autonomic reflexes have shown how stimulation of the skin, muscles and joints can influence the regulation of autonomic functions. In intact anaesthetized animals, somatic stimulation of the limbs can produce sympathetic reflexes, mostly originating from supraspinal structures. In addition, spinal reflexes can be elicited by stimulation of somatic tissues of the trunk or thoracolumbar spinal afferent nerves [9, 10, 16, 17]. These reflexes rely on the activation of preganglionic neurons, through propriospinal pathways (see Sato et al. [13] for an extensive review). However, no study has yet examined the effect of chronic noxious input on somato-sympathetic reflexes. Moreover, limited evidence is available concerning the modulation of sympathetic reflexes by somatosensory input from the thoracic spine specifically.

In intact anesthetized rats, acute noxious chemical stimulation of interspinous tissues, in the form of capsaicin injection, can increase gastric sympathetic nerve activity and strongly decrease gastric motility [4]. These responses are stronger when capsaicin is injected into thoracic compared with lumbar interspinous tissues and are preserved after spinalization. This indicates that nociceptive afferents from the thoracic spine can modulate sympathetic activity segmentally, through propriospinal pathways. Consistent with this finding, noxious mechanical input to thoracic segments of the spinal cord is also effective in increasing renal sympathetic nerve activity, particularly in rats with complete transection of the cervical spinal cord [9]. This is in accordance with spinal pathways providing sympathetic innervation to the kidney, spreading from T5 to T13, with a strong contribution from T9-T11 segments [19].

Overall, previous studies on somato-autonomic reflexes focussed on acute somatic stimuli, showing that they can modulate specific autonomic functions through segmental as well as supraspinal processes [13]. One important question that remains to be investigated is the impact of sustained somatic input



on autonomic regulation. Most relevant to several clinical conditions, the impact of chronic noxious input to thoracic segments of the spinal cord on sympathetic functions remains unexplored. Considering that chronic pain induces neural plasticity in the central nervous system [26], chronic noxious input to thoracic segments of the spinal cord may alter sympathetic regulation. The aim of the present study was to determine whether a specific sympathetic function, namely the regulation of renal blood flow, may be modulated by chronic thoracic pain. Using a rat model of chronic muscle pain (injection of complete Freund adjuvant) [5], we investigated whether renal blood flow (RBF) changes induced by electrical stimulation of the hind paw were altered. Based on a previous study using acute noxious stimulation of the thoracic spine [4], we hypothesized that somato-renal reflexes would be facilitated in rats with chronic thoracic pain compared to control rats. We further hypothesized that this facilitation would be stronger for chronic pain in the lower thoracic spine compared to the upper thoracic spine, in accordance with the segmental organization of renal sympathetic innervation.

## **MATERIALS AND METHOD**

### ***Experimental groups***

Experiments were performed on 30 male Wistar rats (body weight 300-450 g, Charles River Laboratories International, Willmington, MA, USA). The animals were kept in our facilities where a light-dark cycle of 14h-10h was maintained. All experimental procedures were approved by the animal care committee of "Université du Québec à Trois-Rivières", in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

To examine the effect of chronic spinal pain on somato-renal reflexes, experiments were conducted on 3 groups of rats. Rats from the control group (CTL, n=10) received a 150  $\mu$ L isotonic saline injection (NaCl 0,9%) in the left paraspinal muscles (T10). Rats from the two other groups received a 150  $\mu$ L injection of Complete Freund adjuvant (CFA) (Difco Lab., Detroit, MI, USA) in T10 left paraspinal muscles (CFAT10, n=10) or T2 left paraspinal muscles (CFAT2, n=10). All injections were performed under ultra-short isoflurane anaesthesia (Aerrane, Baxter Corporation, Mississauga, Canada). Twelve days after the intramuscular injection of CFA or saline, experiments were conducted as described below (see Experimental procedures).

### ***Surgical procedures***

Surgical procedures were initiated after animals were deeply anesthetized with urethane ( $1.2 \text{ g.kg}^{-1}$  i.p.). The right jugular vein was catheterized and additional urethane doses were administered by bolus i.v. injections (approximately 10% of initial dose) to maintain the depth of anesthesia. In addition to stable systemic arterial blood pressure, the depth of anesthesia was routinely confirmed by the absence of withdrawal reflexes (paw pinching). Systemic mean arterial pressure (MAP) was continuously recorded from a canula inserted into the right common carotid artery (Research grade pressure

transducer model 724496, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Heart rate (HR) was derived from electrocardiographic (ECG) activity recorded continuously (Spike 2, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) using subdermal needle electrodes (Model E2, Grass Medical instruments, Quincy, MA, USA). ECG was amplified 200 times, band pass filtered (3 Hz- 3 KHz) and sampled at 1000 Hz (Model P511K, Grass Medical instruments, Quincy, MA, USA). Animals were artificially ventilated using a tracheal canula (SAR-830/P Ventilator, CWE inc., Ardmore, PA, USA) and end-tidal CO<sub>2</sub> concentration was maintained to 3.5% (CAPSTAR-100 Carbon dioxide analyser, CWE inc., Ardmore, PA, USA) by controlling respiratory rate and tidal volume. Body temperature was monitored with a rectal probe and was maintained at 37.5±0.5 °C with a body temperature control system (TCAT-2LV controller, Physitemp instruments inc, USA).

### ***Experimental procedures and electrical stimulation***

Once surgical procedures were completed, rats were subjected to two protocols. For the first experiment, a stimulus-response curves of RBF changes was obtained with 8 different intensities between 0 and 30 mA, delivered with an interstimulus interval of 180 s. Electrical stimulations were applied to left hind paw after observing the stability and recovery of RBF and arterial pressure after the preceding stimulus. Experiment 2 was performed to examine the effect of acute nociceptive input from the thoracic spine on RBF changes, where stimulation at T2 and T10, in the form of hypertonic saline injections were compared.

Electrical stimulation of the hind paw (trains of 400 pulses of 1-ms duration at 20Hz) was delivered by a train generator (Grass Medical instruments, model S88, Quincy, MA, USA) and a constant-current stimulator (Model DS7, Digitimer Ltd, Welwyn Garden city,UK), using a pair of subdermal needle electrodes

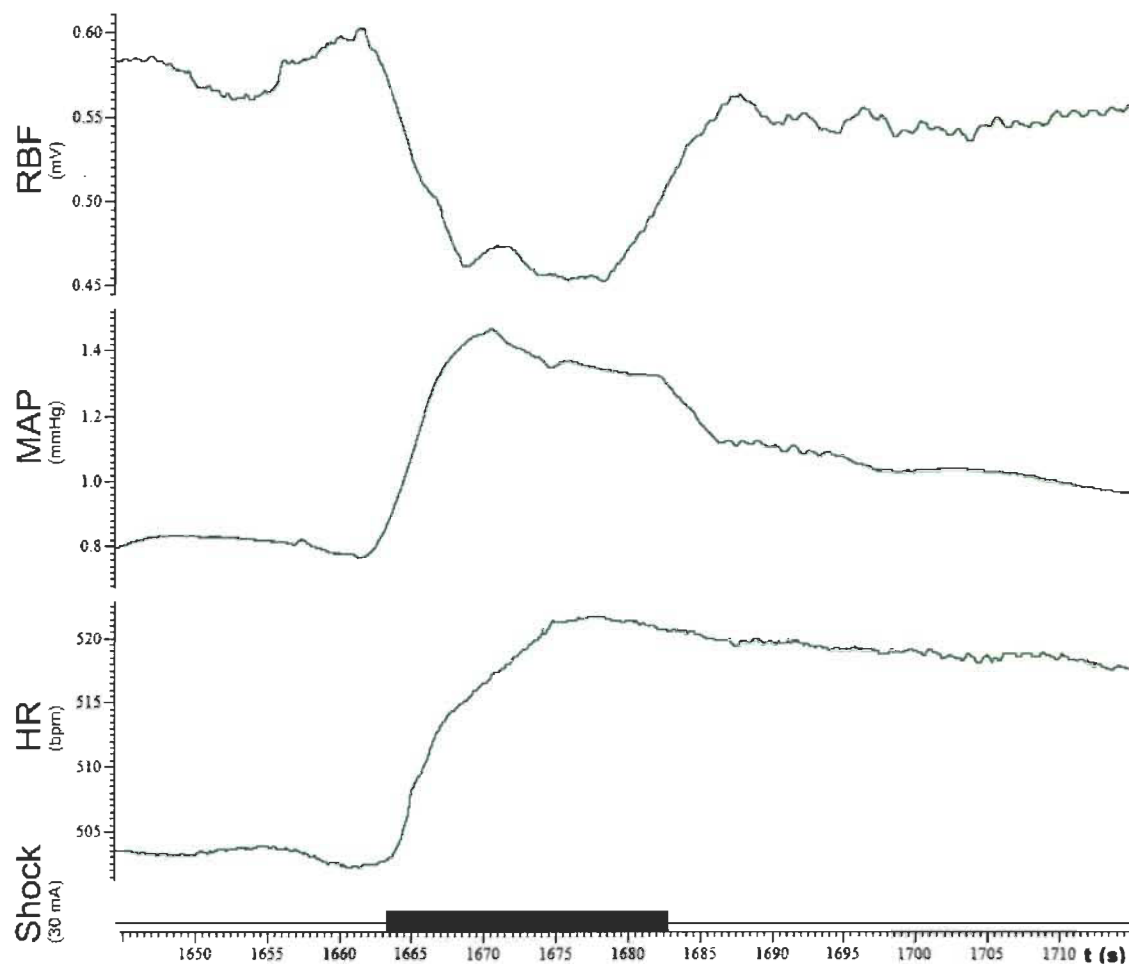
(Model E2, Grass Medical instruments, Quincy, MA, USA) inserted on the lateral aspect of the fourth and fifth digits.

### ***Hypertonic saline injections***

Experiment 2 was performed to assess the segmental modulation of somato-renal reflexes by acute nociceptive input from the thoracic spine. Therefore, 150 $\mu$ L of hypertonic saline (NaCl 6%) [7] was injected in the thoracic paraspinal muscles at the T2 or T10 levels, using a 27-gauge needle within approximately 10 s.

### ***Recording of renal blood flow***

The animal was placed in a prone position, with the left kidney exposed. The kidney was covered with warm paraffin oil in a pool made of sutured skin flaps. RBF was measured using a laser Doppler flowmeter (Micro-needle probe TSD145, Biopac systems, Goleta, CA, USA). The probe was gently placed on the left kidney surface. RBF signal was recorded with a bandwidth of 22KHz, sampled at 120 Hz with a Power1401 acquisition system (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK), and recorded for offline analysis (Spike 2, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). RBF signal was filtered offline with a time constant of 3 seconds (Spike 2, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) (see Figure 1 for an individual example of recordings).



**Fig. 1.** Individual examples of recordings. The 3 top traces represent RBF, MAP and HR recordings, respectively. Shock-evoked RBF responses can be seen as decreasing fluctuations after shock, which is represented by a black rectangle in fourth place, whereas shock-evoked MAP and HR responses can be seen as increasing fluctuations after shocks. The plotted responses of RBF and MAP show mirror-image shapes, the curves sloping in opposite directions.

### **Histology**

At the end of the experiment, rats were perfused through the heart with a 10% formaline solution. Thoracic paraspinal muscles were removed bilaterally. Tissue was dehydrated, cleared and embedded in paraffin (tissue processor, Tissue Tek VIP E300, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Serial sections of

5  $\mu$ m thickness were then cut using a rotary microtome (Reichert Histostat microtome model 820, Reichert Technologies, Depew, NY, USA) and were mounted onto adhesive coated slides. Finally, sections were stained with a hematoxylin-erythrosin-saffron coloration (Autostainer XL, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) for histological examination under a microscope. This allowed confirming the presence of chronic inflammation, as described earlier [5]. One rat from the CFAT10 group did not show clear evidence of chronic inflammation and was excluded from all analyses.

### ***Data analysis and statistics***

For all experimental protocols, RBF, MAP and heart rate (HR) were analysed with Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). In Experiment 1, onset-to-peak amplitude of shock-evoked RBF changes was extracted to quantify the sympathetic response to each shock train and each value was normalized as percentage of a prestimulus control value, representing onset-to-peak amplitude of 30 s at baseline. These values were averaged for each intensity and mean RBF responses were compared statistically between groups. MAP and HR changes were also calculated for each intensity and mean responses were compared statistically. The threshold of shock-evoked RBF and MAP changes were also determined as changes of more than 10% of the prestimulus control value.

In Experiment 2, onset-to-peak amplitude of RBF changes evoked by injections were extracted and values were normalized as percentage of prestimulus control value, representing onset-to-peak amplitude of 30 s at baseline. These values were average and compared between conditions and groups. HR and MAP changes induced by injections at T2 or T10 without hind paw stimulation were also averaged and compared between conditions and groups.

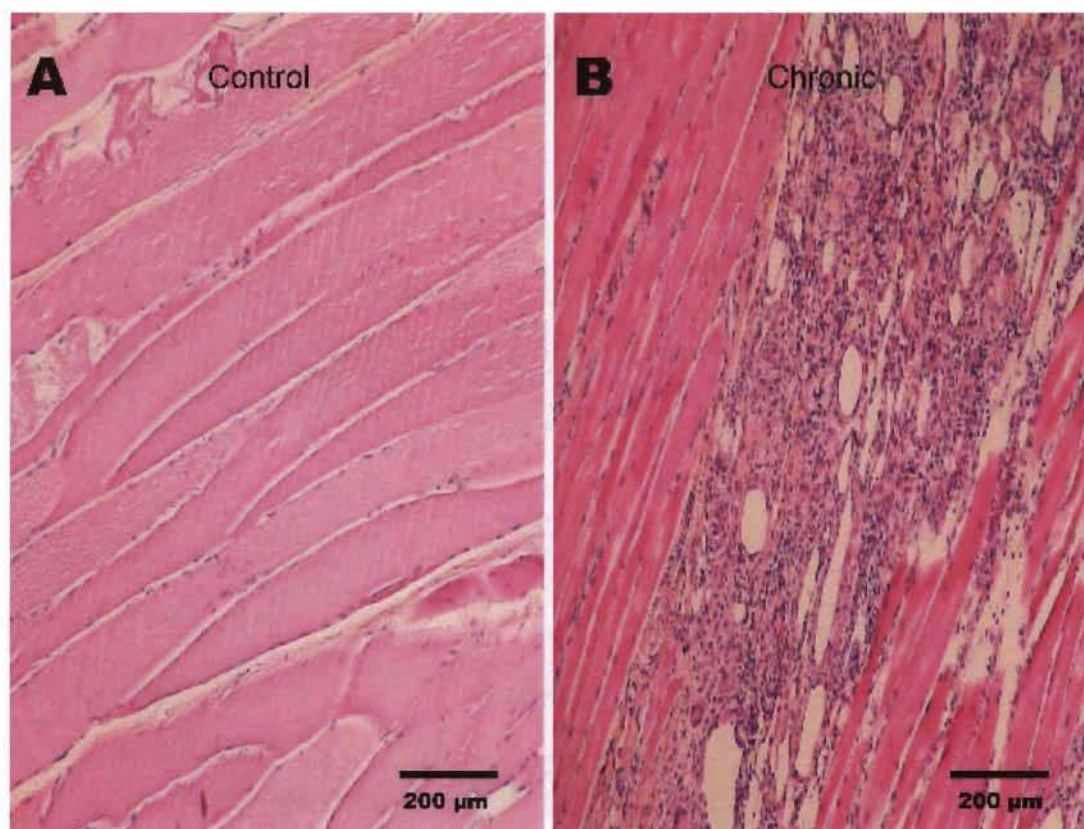
All data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were performed with Statistica v10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). For Experiment 1, shock-evoked RBF and MAP changes threshold were compared between groups using one-way ANOVAs. Shock-evoked RBF, MAP and HR changes at different intensities were compared between groups using mixed model ANOVAs. Significant effects were decomposed using Tuckey's post-hoc test, planned contrasts or Dunnett's multiple comparison test as needed. For Experiment 2, the effect of hypertonic saline injections on RBF, MAP and HR changes were compared between groups and segments using mixed model ANOVAs. Significant effects were decomposed by Tuckey's post-hoc test as needed. The significance threshold was set to  $p < 0.05$  (two-tailed) for all analyses.



## RESULTS

### *Chronic muscle inflammation*

Muscle sections from each animal were examined for the marked presence of leukocyte infiltrations (mainly macrophagic and lymphoid cells) for rats injected with CFA. For rats from the control group, muscle sections were examined to confirm the absence of infiltration. Representative examples of muscle sections from one control and one chronic rat are shown in Figure 2.



**Fig. 2.** Histology of a normal and a muscle inflamed by complete Freund's adjuvant (CFA). (A) Normal, intact paraspinal muscle. (B) Paraspinal muscle 12 days after CFA injection. The muscle contains massive infiltrations of macrophagic and lymphoid cells. Both muscle were formaline fixed, paraffin sections (5-µm) were stained with hematoxylin-erythrosin-saffron.

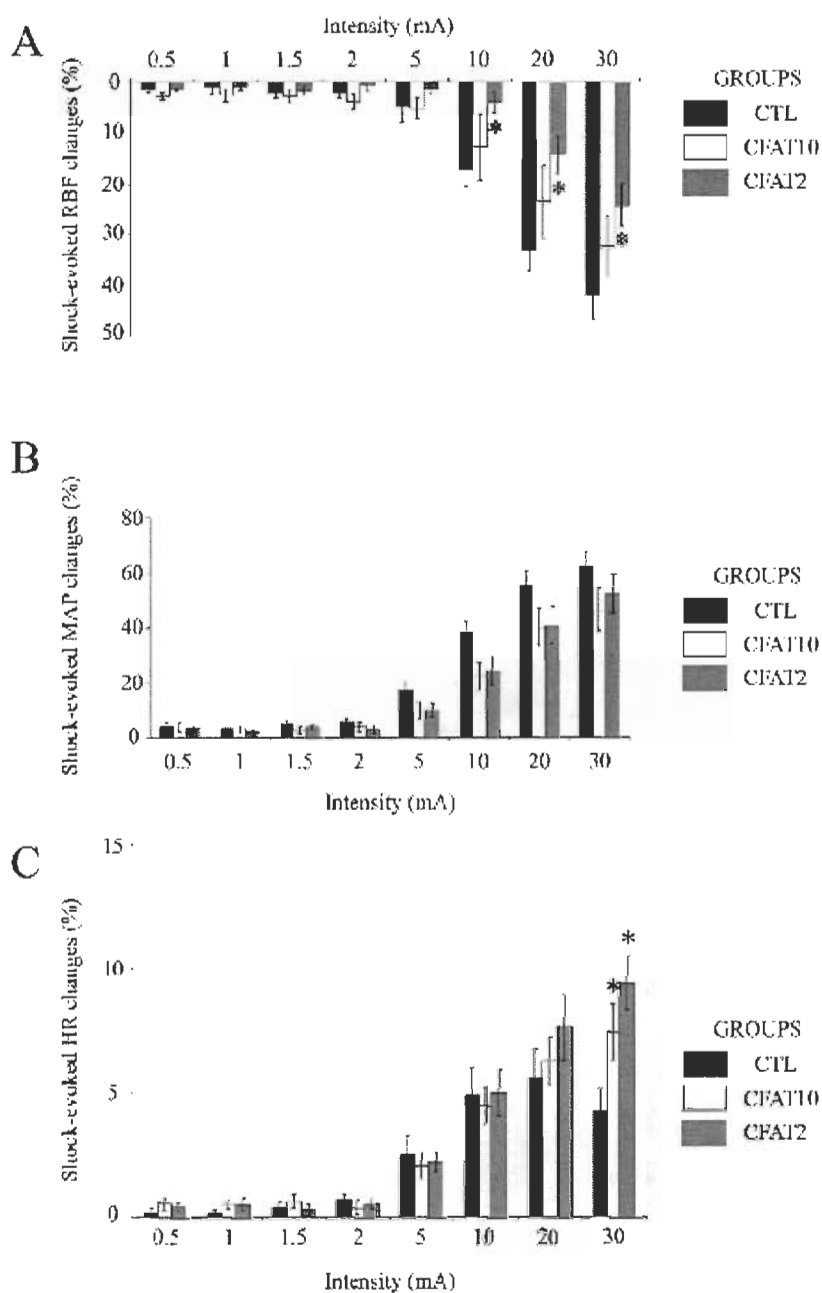
### ***Effect of chronic spinal pain on RBF, MAP and HR regulation***

In order to determine the effect of chronic spinal pain on shock-evoked somato-renal responses, RBF changes were compared between groups for each intensity by a mixed model ANOVA (see Figure 3A). There was a marginal main effect of GROUP ( $F(2,26)=3.3$ ;  $p=0.054$ ) and a robust main effect of INTENSITY ( $F(7,182)=69.3$ ;  $p<0.001$ ). Moreover, the GROUP  $\times$  INTENSITY interaction was significant ( $F(14,182)=2.8$ ;  $p<0.001$ ). For the main effect of GROUP, Tuckey's post-hoc test revealed that shock-evoked RBF changes were significantly lower for the CFAT2 group compared to the CTL ( $p=0.047$ ) but there was no difference between CFAT2 and CFAT10 groups ( $p=0.7$ ) or between CFAT10 and CTL groups ( $p=0.25$ ). For the main effect of INTENSITY, Dunnett's multiple comparison test revealed that shock-evoked RBF was significantly decreased for intensities of 10, 20 and 30 mA compared to 0.5 mA (all  $p$ 's $<0.001$ ). For the GROUP  $\times$  INTENSITY interaction, planned comparisons for intensities inducing significant RBF changes (see main effect of intensity above) revealed that RBF changes were significantly attenuated in the CFAT2 group compared to the CTL group, for 10, 20 and 30 mA (all  $p$ 's $<0.03$ ). However, RBF changes were not significantly different between the CFAT2 and CFAT10 groups or between the CFAT10 and the CTL groups (all  $p$ 's $>0.15$ ). In addition, the RBF response threshold was compared between groups using a one-way ANOVA. Thresholds were significantly different between groups ( $F(2,25)=5.2$ ;  $p=0.013$ ). Tuckey's post-hoc test revealed that thresholds were significantly higher for the CFAT2 group compared to the CTL group ( $p=0.01$ ) but not compared to the CFAT10 group ( $p=0.23$ ). However, thresholds between the CFAT10 and the CTL groups were not significantly different ( $p=0.39$ ).

In order to determine the effect of chronic spinal pain on MAP changes evoked by electrical stimulation at various intensities, MAP changes were compared using a mixed model ANOVA (see Figure 3B). There was a main effect of INTENSITY ( $F(7,182)=133.2$ ;  $p<0.001$ ) but not main effect of GROUP ( $F(2,26)=2.6$ ;  $p=0.10$ ) and no INTENSITY  $\times$  GROUP interaction

( $F(14,182)=1.5; p=0.11$ ). For the main effect of INTENSITY, Dunnett's multiple comparison test revealed that MAP changes were significantly increased for intensities of 5, 10, 20 and 30 mA compared to 0.5 mA (all  $p$ 's  $< 0.01$ ). In addition, the threshold for MAP changes was compared between groups by one-way ANOVA. Thresholds were significantly different between groups ( $F(2,25)=5.6; p=0.010$ ). Tuckey's post-hoc test revealed that thresholds were significantly higher for the CFAT2 group compared to the CTL group ( $p=0.033$ ) and to the CFAT10 group ( $p=0.014$ ). However, thresholds between the CFAT10 and the CTL groups were not significantly different ( $p=0.8$ ).

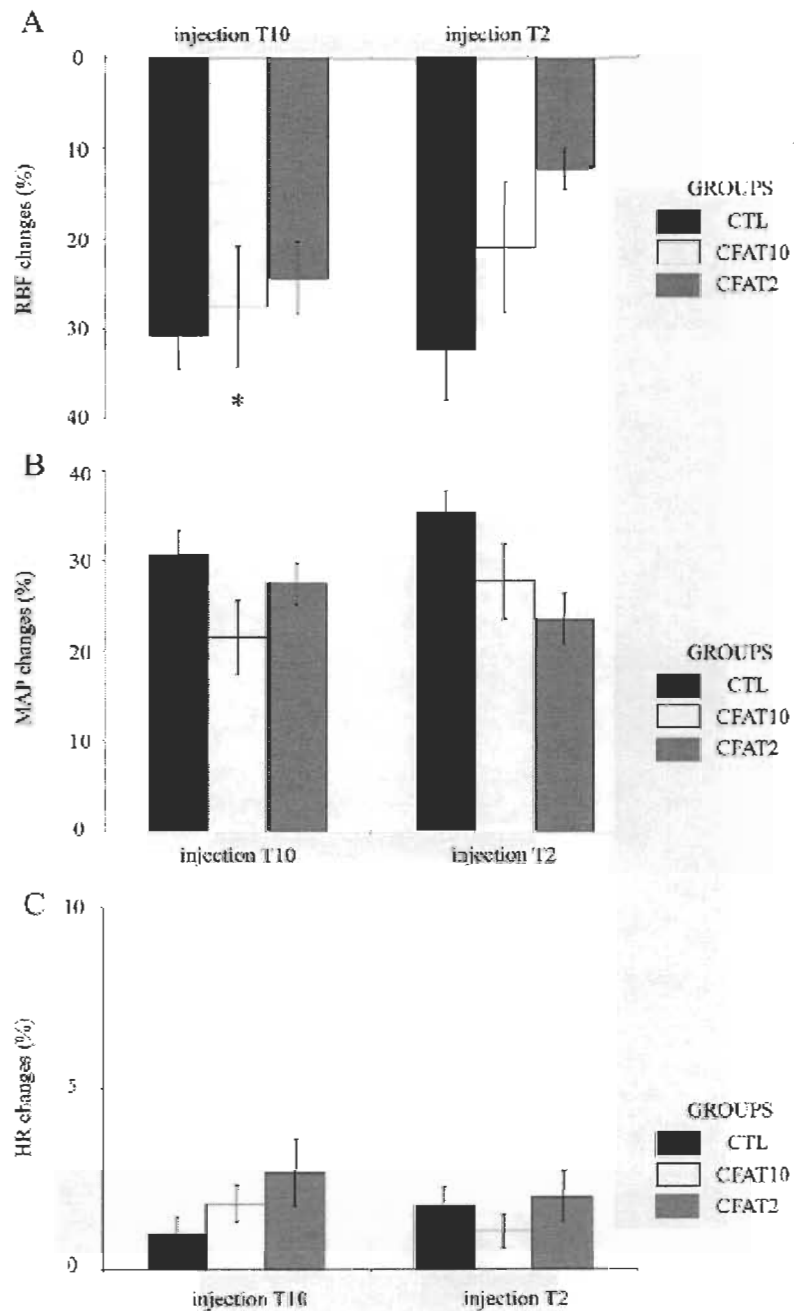
In order to determine the effect of chronic spinal pain on HR changes evoked by electrical stimulation at various intensities, HR changes were compared using a mixed model ANOVA (see Figure 3C). There was a main effect of INTENSITY ( $F(7,182)=79.2; p<0.001$ ) but no main effect of GROUP ( $F(2,26)=1.12; p=0.34$ ). Moreover, there was a significant GROUP X INTENSITY interaction ( $F(14,182)=3.0; p<0.001$ ). For the main effect of INTENSITY, Dunnett's multiple comparison test revealed that intensities of 5, 10, 20 and 30 mA, HR was modestly but significantly increased compared to the intensity of 0.5 mA (all  $p$ 's  $< 0.001$ ). For the INTENSITY X GROUP interaction, planned comparisons for intensities inducing significant HR changes (see main effect of intensity above) revealed that HR changes were significantly increased in the CFAT2 group and the CFAT10 groups compared to the CTL group ( $p=0.001$  and  $p=0.037$ , respectively) at 30 mA. However, HR changes were not significantly different for all other comparisons (all  $p$ 's  $> 0.2$ ). These results indicate that shock-evoked somato-renal responses were decreased when chronic spinal pain was at T2. Chronic spinal pain, both at T2 and T10, induced facilitated shock-evoked HR changes at the highest intensity of 30 mA.



**Fig. 3.** RBF (A), MAP (B) and HR (C) responses to electrical stimulations at various intensities. Symbols indicate the level significance after mixed ANOVA. \* $p < 0.05$ .

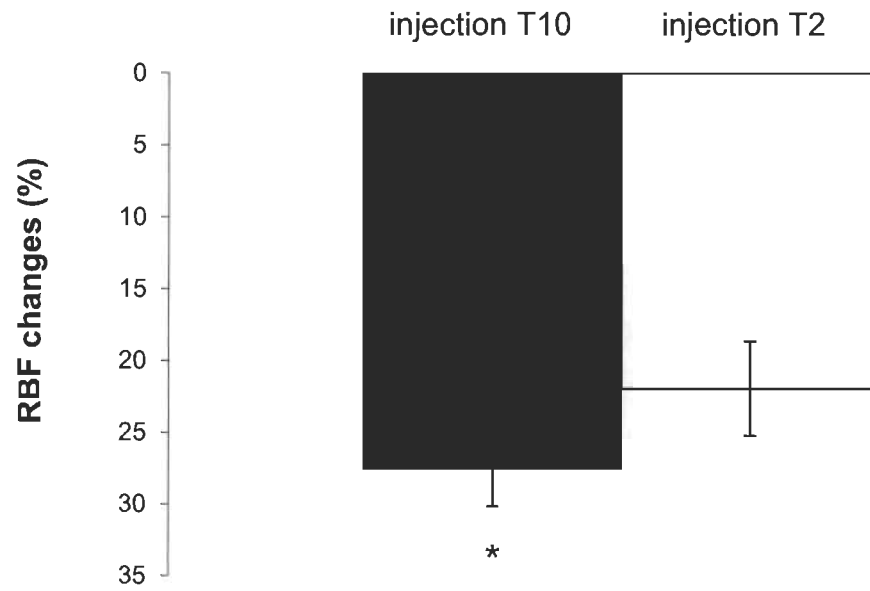
### ***Effect of thoracic hypertonic saline injections on RBF, MAP and HR changes***

As shown on Figure 4A-C, the effect of acute thoracic noxious stimulation (in the form of hypertonic saline injection) on RBF, MAP and HR were compared between groups and segments by mixed model ANOVA. For RBF changes, groups were not significantly different ( $F(2,25)=2.54$ ;  $p=0.10$ ). However, there was a main effect of SEGMENT, where the T10 stimulation evoked larger RBF decreases compared to the T2 stimulation ( $F(1,25)=4.4$ ;  $p=0.047$ ), as shown on Figure 5. Nevertheless, there was no GROUP X SEGMENT interaction ( $F(2,25)=2.4$ ;  $p=0.12$ ). For MAP changes, there was a main effect of GROUP ( $F(2,25)=3.6$ ;  $p=0.042$ ) but no main effect of SEGMENT ( $F(1,25)=1.4$ ;  $p=0.25$ ) and no GROUP X SEGMENT interaction ( $F(1,25)=2.6$ ;  $p=0.09$ ). For the main effect of GROUP, the Tuckey's post-hoc test revealed only marginal differences between groups (all  $p$ 's  $>0.07$ ). As for HR changes, there was no main effect of SEGMENT ( $F(1,25)=0.2$ ;  $p=0.6$ ), no main effect of GROUP ( $F(2,25)=1.2$ ;  $p=0.3$ ) and no interaction ( $F(1,25)=1.3$ ;  $p=0.3$ ). These results indicate that acute nociceptive stimulation of thoracic paraspinal muscles induces larger RBF changes when injected segmentally to renal sympathetic output. However, chronic inflammation did not alter these changes.



**Fig. 4.** Responses (mean  $\pm$  SEM) of RBF (A), MAP (B) and HR (C) after injection of 150  $\mu$ L of 6% hypertonic saline at T10 and T2. (A) Acute noxious stimuli at T10 were significantly different. Symbols indicate the level of significance after mixed ANOVA. \*  $p < 0.05$ .





**Fig. 5.** RBF changes (mean  $\pm$  SEM) after injection of 150  $\mu$ L of 6% hypertonic saline at T10 and T2 all groups together. Acute noxious stimuli at T10 were significantly different. Symbols indicate the level of significance after mixed ANOVA. \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that chronic inflammation of paraspinal muscles could alter somato-renal reflexes. Interestingly, rats with chronic spinal pain at T2 showed attenuated shock-evoked RBF changes. Importantly, a higher threshold of RBF changes in rats with chronic inflammation at T2 suggests that chronic inflammation can modulate somato-renal reflex and could alter RBF regulation. Moreover, chronic inflammation of paraspinal muscles also increased shock-evoked HR changes at the highest intensity. In addition, acute thoracic noxious stimulation, in the form of hypertonic saline injections, induced robust and larger RBF responses with injections at T10 in all groups. However, chronic spinal pain did not alter these acute changes. This is the first study to show that somato-autonomic reflexes can be affected by chronic spinal pain.

### ***Effect of chronic spinal pain on RBF and HR changes***

In the present work, somato-renal reflexes were elicited by cutaneous electrical stimulation of the left hind paw. These stimuli evoked stable renal blood flow responses. It has been shown in various studies that stimulation of lower limb afferents can produce somato-sympathetic reflexes originating from supraspinal structures[13]. In the present study, the choice of the stimulation site, i.e., paraspinal muscles and chronic inflammation using an algescic agent such as CFA was made with the intention of creating conditions mimicking chronic back pain, close to the clinical reality. Moreover, the choice of paraspinal muscles as the stimulation site and CFA-induced chronic inflammation were made to test whether chronic spinal pain may modulate shock-evoked RBF changes through supraspinal and propriospinal pathways. Chronic spinal pain at T10 aimed at changing RBF changes more specifically. Sympathetic innervation of the kidney rely on the activation of different populations of preganglionic neurons originating mainly in the intermediolateral column of the spinal cord, at levels between T5 and the rostral end of T13; the largest number of neurons

residing at T10[19]. The present study, however, demonstrates that chronic spinal pain at T2 induced attenuated shock-evoked RBF changes and higher RBF changes threshold. These different findings might be attributable to the different modalities used in previous studies on somato-visceral reflexes [3, 4, 9, 13, 22, 23] and the fact that previous studies concentrated on acute stimulation and neglected the impact of sustained nociceptive stimulation. Interestingly, the effect was stronger for afferent input from T2 paraspinal muscles that would enter the cord at a level which provides limited or no sympathetic innervation to the kidney. These novel findings may be explained by at least three mechanisms.

First, one likely mechanism is the activation of descending systems such as diffuse noxious inhibitory controls, due to heterotopic noxious input [11]. Accordingly, supra-spinal neurons that terminate in the dorsal horn can cause diffuse inhibition of nociceptive transmission[25]. Previous animal studies with peripheral CFA-induced inflammation demonstrated alterations in descending modulation and an enhancement of descending inhibition. Diffuse noxious inhibitory controls have been studied in a variety of pain conditions, and regional differences in its activation has been demonstrated. For instance, chronic neck pain patients showed an impaired activation of diffuse noxious inhibitory controls, as these mechanisms were not found to be deficient in chronic low back pain patients[24]. More research on this unexplained topic is needed, as in discrepancies in pain-induced descending modulation between upper thoracic and lower thoracic spinal pain. Regional variations in these spinal neurons receptive fields' are being suspected. The current results, therefore, support the hypothesis that the plasticity of somato-renal reflexes induced by chronic spinal pain could be explained, at least in part, by descending inhibitory processes. Although the impact of these mechanisms remains to be determined[25].

Another possibility that may explain part of the present results is the modulation of somato-renal reflexes by propriospinal changes such as apoptosis

of spinal neurons and interneurons. Sustained nociceptive afferent activity are known to induce apoptosis of dorsal horn neurons and spinal interneurons[18]. Accordingly, the ongoing thoracic nociceptive afferent activity may induce neuronal degeneration and could induce apoptosis of preganglionic neurons and autonomic interneurons. Possible apoptosis of autonomic neurons and interneurons explains attenuated sympathetically mediated shock-evoked RBF changes. However, we suggest that alterations of somato-renal reflexes by chronic pain at T2 is less likely to be explained by propriospinal changes, since the spinal cord at that level provides limited or no sympathetic output to the kidney. Moreover, chronic pain is known to mainly cause an apoptosis of inhibitory spinal interneurons, leading to a decrease in spinal inhibition[18] and, in our case, would have led to increased sympathetically mediated shock-evoked RBF changes instead of the observed attenuations.

Furthermore, shock-evoked RBF changes attenuations were significant with chronic spinal pain at T2 level, close the cardiac sympathetic output (T1-T6) [20]. The modulation observed could be explained by an increased cardiac sympathetic activity, generating systemic cardiovascular changes and therefore decreasing sympathetically mediated shock-evoked RBF change. This would be consistent with what has been observed on somatocardiovascular reflexes induced by acute procedures[9, 10]. Since HR changes were also modulated by chronic spinal pain, it remains to be determined whether shock-evoked RBF changes attenuations are specifically due to spinal modulation or by the action of supraspinal structures on the plasticity of somato-renal reflexes. Moreover, the impact of vagal nerve activity on somato-cardiovascular[15] responses could not be discarded.

### ***Effect of acute thoracic nociceptive stimulations on RBF, MAP and HR changes***

In the present work, acute thoracic nociceptive stimulation in the form of injections of hypertonic saline was used to mimick acute back muscle pain and

to evoke robust RBF changes. Injection of hypertonic saline is known to evoke nociceptive activity in acutely anesthetized rats and localized muscle pain in humans[12, 21]. According to the renal sympathetic outflow (predominantly T10), stimuli were purposefully applied on specific paraspinal areas (T2 and T10) and stimuli applied at T10 aimed at changing RBF responses more specifically. As expected, the present results indicate that acute noxious stimulation applied at T10 paraspinal muscles evoked larger RBF decreases compared to the T2, relying on the activation of preganglionic neurons of the renal sympathetic outflow [2, 19, 20]. Therefore, the present findings support the fact that somatic stimulation of the thoracic paraspinal muscles may modulate specific sympathetic pathways, partly through segmental processes. These results are consistent with animal studies showing segmentally mediated somato-sympathetic reflexes by stimulation of trunk afferents in rats with intact spinal cords. Indeed, noxious (pinching) stimulation of the trunk can reflexly decrease the pyloric pressure via sympathetic nerve branches[14]. This cutaneo-gastric reflex of propriospinal origin also demonstrates a remarkable segmental organization. Likewise, noxious stimulation of the trunk can elicit segmentally organized increase of adrenal nerve activity, and epinephrine and norepinephrine secretion rates[1]. Furthermore, noxious chemical stimulation of thoracic interspinous tissues creates an inhibitory response of gastric motility via increased gastric sympathetic nerve activity[4]. Similarly to the present study, these effects were partly mediated by segmental processes, since robust responses were evoked when the algescic agent, capsaicin, was injected in tissues served by afferents that enter the spinal cord closer to sympathetic outflow to the stomach. Our results are also consistent with a recent human research from our group[6], and with what has been postulated for lumbar sympathetic systems[8].

Interestingly, the present data indicates for the first time that chronic inflammation may not alter somato-renal RBF changes evoked by injections of hypertonic saline, although chronic muscle inflammation is known to alter spinal

pain systems. Inflammation causes peripheral sensitization, dorsal horn neurons changes and may facilitate pain transmission[26]. Surprisingly, this data may support the absence of autonomic preganglionic sensitization in chronic thoracic inflammation. Nevertheless, the present results clearly indicate that chronic spinal inflammation does not induce alterations of somato-renal RBF changes evoked by injections of hypertonic saline.

### ***Limitations and future directions***

The foremost limitation of this study is the lack of measurement to monitor nerve activity to compare with the RBF changes. Since RBF responses measured by laser Doppler flowmeter does not represent the absolute RBF of the kidney, it would have been interesting to record the sympathetic renal nerve activity to further confirm the somato-sympathetic reflex responses. In future work, it would be newsworthy to examine the effect of acute and chronic noxious stimulation on the 2 components of sympathetic nerve reflexes, i.e. A- and C-reflexes, which are less likely to be influenced by cardiovascular confounding factors. The current experiment was designed to control for some potential cardio-vascular confounding factors, such as mean arterial pressure and heart rate and these were non-significant to variations of RBF changes. Another mechanism that should be addressed is the potential contribution of vagal nerve activity on somato-cardiovascular responses. In addition, more studies are needed to determine the precise mechanism by which chronic vertebral inflammation alters renal blood flow regulation. Lastly, it would be interesting to assess whether the present results could be generalized to other somato-autonomic responses. Since this is the first work in this line of study, future investigations should test the impact of chronic muscle pain on other autonomic responses and determine if other harmful effects occur via somato-sympathetic reflexes.



## **Conclusion**

Hence, the important findings in this study are that chronic spinal pain at T2 induces attenuated shock-evoked RBF changes. Importantly, the present results also suggest that chronic spinal inflammation may not alter acute somato-renal RBF changes. Altogether, these results implies that chronic spinal pain could alter autonomic nervous system functions such as renal blood flow regulation. However, the underlying mechanisms responsible for these alterations remain to be determined.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This project was funded by the « Chaire de Recherche en Chiropratique FRCQ/Platinum Systems ». Sébastien Houle and Renaud Jeffrey-Gauthier were supported by the « Fondation de Recherche en Chiropratique du Québec ». Sébastien Houle was also supported by the « Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières ». The authors wish to thank Dr Robert Perron, M. Denis Bouchard and the pathology team of the « Centre hospitalier régional de Trois-Rivières » for their help and excellent technical assistance.

## REFERENCES

- [1] T. Araki, K. Ito, M. Kurosawa, A. Sato, Responses of adrenal sympathetic nerve activity and catecholamine secretion to cutaneous stimulation in anesthetized rats, *Neuroscience* 12 (1984) 289-299.
- [2] L. Barajas, L. Liu, K. Powers, Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin, *Can J Physiol Pharmacol* 70 (1992) 735-749.
- [3] B. Budgell, A. Sato, A. Suzuki, S. Uchida, Responses of adrenal function to stimulation of lumbar and thoracic interspinous tissues in the rat, *Neurosci Res* 28 (1997) 33-40.
- [4] B. Budgell, A. Suzuki, Inhibition of gastric motility by noxious chemical stimulation of interspinous tissues in the rat, *J Auton Nerv Syst* 80 (2000) 162-168.
- [5] M. Chacur, D. Lambert, U. Hoheisel, S. Mense, Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: An immunohistochemical and behavioural study in rats, *Eur J Pain* 13 (2009) 915-923.
- [6] A. Desmarais, M. Descarreaux, S. Houle, M. Piché, Tuning the gain of somato-sympathetic reflexes by stimulation of the thoracic spine in humans, *Neurosci Lett* 490 (2011) 107-111.
- [7] T. Graven-Nielsen, L. Arendt-Nielsen, S. Mense, *Fundamentals of Musculoskeletal Pain*, IASP press, Seattle, USA, 2008, 496 pp.
- [8] W. Jänig, *The integrative action of the autonomic nervous system*, Cambridge university press, Cambridge, UK, 2006, 610 pp.
- [9] A. Kimura, H. Ohsawa, A. Sato, Y. Sato, Somatocardiovascular reflexes in anesthetized rats with the central nervous system intact or acutely spinalized at the cervical level, *Neurosci Res* 22 (1995) 297-305.
- [10] A. Kimura, A. Sato, Y. Sato, H. Suzuki, A- and C-reflexes elicited in cardiac sympathetic nerves by single shock to a somatic afferent nerve include spinal and supraspinal components in anesthetized rats, *Neurosci Res* 25 (1996) 91-96.

- [11] D. Le Bars, J.C. Willer, I.B., Diffuse Noxious Inhibitory Controls (DNIC). *The Senses: A Comprehensive Reference*, Academic Press, New York, 2008, pp. 763-773.
- [12] J.Y. Ro, N.F. Capra, J.-s. Lee, R. Masri, Y.-H. Chun, Hypertonic saline-induced muscle nociception and c-fos activation are partially mediated by peripheral NMDA receptors, *Eur J Pain* 11 (2007) 398-405.
- [13] A. Sato, Y. Sato, R.F. Schmidt, The impact of somatosensory input on autonomic functions, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 130 (1997) 1-328.
- [14] A. Sato, Y. Sato, F. Shimada, Y. Torigata, Changes in gastric motility produced by nociceptive stimulation of the skin in rats, *Brain Res* 87 (1975) 151-159.
- [15] A. Sato, Y. Sato, F. Shimada, Y. Torigata, Varying changes in heart rate produced by nociceptive stimulation of the skin in rats at different temperatures, *Brain Res* 110 (1976) 301-311.
- [16] A. Sato, R.F. Schmidt, Somatosympathetic Reflexes: Afferent Fibers, Central Pathways, Discharge Characteristics, *Physiol Rev* 53 (1973) 916-947.
- [17] A. Sato, R.F. Schmidt, Spinal and supraspinal components of the reflex discharges into lumbar and thoracic white rami, *J Physiol* 212 (1971) 839-850.
- [18] J. Scholz, D.C. Broom, D.-H. Youn, C.D. Mills, T. Kohno, M.R. Suter, K.A. Moore, I. Decosterd, R.E. Coggeshall, C.J. Woolf, Blocking Caspase Activity Prevents Transsynaptic Neuronal Apoptosis and the Loss of Inhibition in Lamina II of the Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury, *J Neurosci* 25 (2005) 7317-7323.
- [19] L.P. Schramm, A.M. Strack, K.B. Platt, A.D. Loewy, Peripheral and central pathways regulating the kidney: a study using pseudorabies virus, *Brain Res* 616 (1993) 251-262.
- [20] A.M. Strack, W.B. Sawyer, L.M. Marubio, A.D. Loewy, Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat, *Brain Res* 455 (1988) 187-191.

- [21] P. Svensson, L. Arendt-Nielsen, H. Nielsen, J.K. Larsen, Effect of chronic and experimental jaw muscle pain on pain-pressure thresholds and stimulus- response curves, *J Orofacial Pain* 9 (1995) 347-356.
- [22] R. Swenson, A. Sato, Sympathetic nervous system response to mechanical stress of the spinal column in rats, *J Manipulative Physiol Ther* 7 (1984) 141-147.
- [23] G. Tallarida, F. Baldoni, G. Peruzzi, F. Brindisi, G. Raimondi, M. Sangiorgi, Cardiovascular and respiratory chemoreflexes from the hindlimb sensory receptors evoked by intra-arterial injection of bradykinin and other chemical agents in the rabbit, *J Pharmacol Exp Ther* 208 (1979) 319-329.
- [24] G. van Wijk, D.S. Veldhuijzen, Perspective on Diffuse Noxious Inhibitory Controls as a Model of Endogenous Pain Modulation in Clinical Pain Syndromes, *J Pain* 11 408-419.
- [25] H. Vanegas, H.-G. Schaible, Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?, *Brain Res Rev* 46 (2004) 295-309.
- [26] C.J. Woolf, M.W. Salter, Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain, *Science* 288 (2000) 1765-1768.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

La présente étude s'est intéressée aux effets de la douleur chronique sur le réflexe somato-rénal. Nous avons d'abord mis au point un modèle animal de douleur vertébrale chronique (rat), avec l'induction d'inflammation chronique par le CFA au niveau des muscles paravertébraux. Une stimulation nociceptive aiguë des mêmes muscles induit des changements du débit sanguin rénal plus importants lorsque les injections sont faites aux mêmes segments que l'organisation préganglionnaire sympathique rénal. Ceci est cohérent avec les études antérieures. Par contre, cette réponse ne semble pas affectée par la douleur chronique. De plus, la douleur chronique à T2 induit une atténuation des changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs. Cette étude démontre les effets de la douleur chronique sur une fonction autonome, soit la régulation du débit sanguin rénal. Les résultats observés nous indiquent que l'inflammation chronique dans les muscles paravertébraux est donc un bon modèle pour étudier l'impact de la douleur vertébrale chronique sur les fonctions du système nerveux autonome.

#### **4.1 Impact de la douleur chronique sur les réponses somato-autonomiques lors de stimulations de la patte postérieure (expérience 1)**

Chez l'humain, il a été montré que les réflexes somato-sympathiques pouvaient être modulés par des stimulations vertébrales thoraciques (Desmarais et al. 2011). Plus précisément, une stimulation nociceptive tonique sous forme de chaleur sur la peau aux niveaux thoraciques T3-T5 a provoqué une augmentation segmentaire des réflexes sympathiques supraspinaux (amplitude de la réponse de conductance de la peau) évoquée par stimulation électrique phasique du nerf sural. Ainsi, la réponse de conductance des membres

supérieurs évoquée par les chocs était significativement augmentée lorsque la stimulation était appliquée aux mêmes segments que l'organisation sympathique pour la sudation des membres supérieurs (T2-T6). De plus, la manipulation vertébrale a démontré l'effet inverse, soit des diminutions de l'amplitude de la réponse de conductance de la peau. De plus, il a été montré que l'ensemble de ces résultats ne pouvaient pas être explicable par des effets non-spécifiques comme l'habituation, la relaxation ou l'anxiété. L'étude de Desmarais et al. (2011) est aussi d'un intérêt particulier puisque le paradigme expérimental est très similaire à celui de l'étude présentée dans ce mémoire.

Les résultats les plus novateurs de notre étude ont certainement été l'effet de la douleur vertébrale chronique sur la plasticité des réflexes somato-rénaux. Selon nos connaissances, cette étude est la première à avoir investigué l'effet de la douleur chronique sur la plasticité des réflexes somato-rénaux, et de manière générale, sur les réflexes somato-autonomiques. Comme mentionnée précédemment, l'innervation sympathique rénale repose sur l'activité des neurones préganglionnaires situés au sein de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière, plus précisément entre les niveaux vertébraux de T5 à T13. La douleur chronique à T10, à proximité de l'organisation préganglionnaire sympathique rénale, visait à induire de plus grands changements de débit sanguin rénal. Par contre, nos résultats démontrent qu'en présence de la douleur chronique à T2, rostrale à l'organisation préganglionnaire sympathique rénale, les changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs sont moins importants. De plus, une augmentation significative du seuil à T2 était observée. Ces résultats inattendus pourraient être attribuables au fait que notre hypothèse est basée sur les résultats obtenus avec des stimuli aigus et que les effets de stimuli nociceptifs soutenus sont encore méconnus. Il s'avère donc que les effets observés sont plus importants lorsque les afférences nociceptives soutenues sont à T2, qui contient peu ou pas de neurones préganglionnaires rénaux. Par contre, ces effets sont aussi observés pour le groupe à T10, mais ils

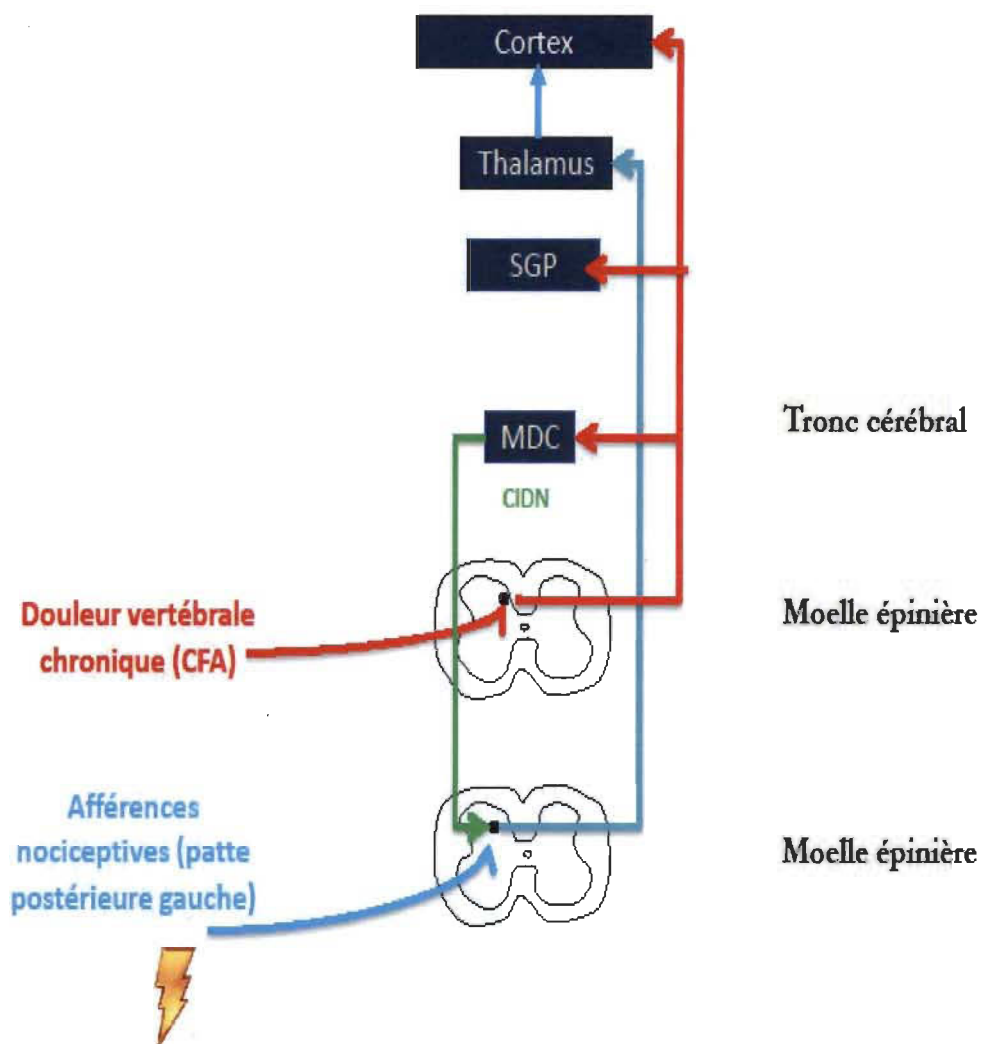
ne sont pas significatifs. Nos résultats peuvent s'expliquer par au moins trois mécanismes connus.

En premier lieu, nos résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de l'activité tonique des neurones sympathiques préganglionnaires. Cette augmentation pourrait diminuer l'amplitude relative des changements phasiques induits par des stimulations nociceptives. Une douleur musculaire tonique est connue pour augmenter l'activité sympathique des neurones vasoconstricteurs sympathiques (Horeysek and Janig 1974). La sensibilisation des nocicepteurs activeraient l'activité sympathique du système cardiovasculaire (Sato et al. 1984). Nos résultats seraient compatibles avec de récents résultats obtenus chez l'humain où une douleur musculaire soutenue crée une augmentation de l'activité des neurones sympathiques et des changements modestes de la pression artérielle (Fazalbhoy et al. 2012). Des enregistrements électrophysiologiques nous permettraient de quantifier l'activité du nerf sympathique rénal et des nerfs sympathiques cardiaques afin de mieux documenter l'activité tonique des neurones sympathiques et décrire les changements somato-rénaux observés.

Deuxièmement, les résultats obtenus pourraient être attribuables à l'effet des systèmes descendants engendrés par la contre-irritation. La contre-irritation se résume en l'application d'un stimulus nociceptif pour inhiber un autre stimulus nociceptif (LeBars et al. 1979). Chez le rat, l'activité des neurones nociceptifs à convergence de la corne dorsale peut être inhibée par des stimulations nociceptives appliquées sur un territoire différent du champ récepteur excitateur périphérique. Ce mécanisme est aussi connu sous le nom de contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN) (LeBars et al. 1979). Les CIDN reposent sur le fait qu'une stimulation nociceptive, en plus de conduire ses afférences vers les centres supérieurs, va aussi établir des connexions dans le tronc cérébral plus précisément au sein de la moelle allongée caudale dans une région appelée Subnucleus Reticularis Dorsalis. Des projections descendantes à



travers le faisceau dorsolatéral se terminent ensuite au sein de la corne dorsale à tous les segments de la moelle épinière. Les interneurons de la corne dorsale de la moelle épinière exercent leur inhibition en libérant des opioïdes endogènes qui vont agir sur des récepteurs spécifiques au niveau des neurones convergents et aussi des terminaisons des afférences nociceptives. La modulation descendante de l'activité nociceptive est aussi sous le contrôle d'autres structures supraspinales telles que le cortex somatosensoriel, la moelle rostroventromédiale et la moelle dorsocaudale (Millan 2002). Il est donc possible que la douleur chronique à T2 ait engendré une inhibition de la réponse somato-rénale évoquée par les chocs, par l'intermédiaire de CIDN. Ces mécanismes sont illustrés à la figure 4.1. La plasticité des réflexes somato-rénaux serait donc attribuable à ces processus inhibiteurs descendants. Les neurones impliqués dans la transmission des signaux nociceptifs à la patte postérieure, soit dans le champ récepteur des neurones de la corne dorsale lombaire semblent être inhibés plus efficacement pour le groupe T2 que pour le groupe T10. La stimulation nociceptive thoracique soutenue la plus éloignée du territoire du champs récepteur excitateur entraînent donc une plus forte inhibition. Quoi qu'il en soit, sachant que les CIDN font intervenir différents mécanismes opioïdiques, il serait possible d'identifier la contribution des CIDN aux résultats observés. Ainsi, un paradigme expérimental identique au nôtre avec l'utilisation de naloxone, antagoniste opioïdique, saurait mettre en évidence l'implication de la modulation descendante des CIDN et son rôle dans la plasticité des réflexes somato-rénaux induite par la douleur vertébrale chronique.



**Figure 4.1 : Schéma des contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive (CIDN)** (substance grise périaqueducale (SGP), moelle dorsocaudale (MDC)). En bleu, on note les voies afférentes suite à la stimulation nociceptive à la patte postérieure gauche. En rouge, on note la contre-irritation par la douleur vertébrale chronique induite par injection de CFA. Les mécanismes et voies descendantes des CIDN sont illustrés en vert.

Un troisième mécanisme pouvant expliquer nos résultats reposerait sur des changements spinaux. Ces changements s'appuient sur les mécanismes régis par les réseaux spinaux, impliquant les interneurons et les fibres sympathiques préganglionnaires. Selon nos résultats, la douleur vertébrale homosegmentaire altère partiellement les réponses somato-rénales. Lors d'une douleur vertébrale chronique affectant les tissus paravertébraux de T2, les changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs étaient atténués. Un autre modèle élégant de douleur chronique a su mettre en évidence le rôle de l'apoptose neuronale au sein de la moelle épinière (Scholz et al. 2005). En effet, une stimulation nociceptive soutenue entraîne l'apoptose des interneurons GABAergiques. Ces mécanismes sont différents de ceux impliqués dans l'excitotoxicité et l'ischémie, puisque la mort neuronale observée due à la douleur chronique apparaît environ 7 jours après la lésion. Comme ces résultats ont été obtenus au niveau de la région lombaire (L4-L5), d'autres études devront confirmer l'impact de la douleur chronique sur la région thoracique, où sont localisés les neurones préganglionnaires sympathiques, afin de mieux comprendre la plasticité des réponses somato-autonomiques. Donc, les réponses atténuées de débit sanguin rénal pourraient être attribuables à une possible apoptose des neurones préganglionnaires sympathiques et d'interneurons autonomiques spinaux. La région de T2 se trouve justement au niveau de l'organisation préganglionnaire des neurones sympathiques cardiaques qui est de T1-T6 (Strack et al. 1988). Un mécanisme probable serait une atteinte des neurones préganglionnaires sympathiques cardiaques qui entraînerait des réponses vasculaires systémiques atténuées telle une diminution de la force de contraction du cœur puisque les atténuations de changements de débit sanguin rénal étaient observées chez le groupe avec douleur chronique à T2, et ce niveau spinal contient peu de neurones préganglionnaires sympathiques rénaux.

Puisque les atténuations de changements de débit sanguin rénal étaient observées chez le groupe avec douleur chronique à T2, une autre possibilité

s'ajoute, soit une sensibilisation des neurones préganglionnaires sympathiques cardiaques chez nos groupes avec douleur vertébrale chronique. Des stimulations nociceptives sont bien connues pour augmenter l'activité efférente des nerfs sympathiques cardiaques (Kimura et al. 1995 ; Kimura et al. 1996). Ainsi, une sensibilisation des neurones préganglionnaires sympathiques cardiaques pourrait augmenter les réponses de fréquence cardiaque et la force de contraction cardiaque, ce qui est conséquent avec nos résultats obtenus pour les changements de fréquence cardiaque évoqués par les chocs. Ces changements cardiaques entraînent à leur tour des changements vasculaires systémiques pouvant se traduire par des changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs de moindre importance, comme ce qui est observé significativement à T2, et non significativement à T10, qui contiennent peu de neurones préganglionnaires sympathiques cardiaques. Quoiqu'il en soit, une caractérisation des changements spinaux chez les groupes chroniques permettra de confirmer cette hypothèse.

Certes, les mécanismes sur lesquels reposent la plasticité des réflexes somato-rénaux chez le rat sont encore nébuleux et des études portant sur les systèmes descendants, les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs et la caractérisation des changements spinaux permettront sans doute d'éclaircir cette question.

#### **4.2 Mécanismes de modulation des changements de débit sanguin rénal lors de stimulations du tronc (expérience 2)**

Étant donné que la douleur vertébrale chronique d'origine musculo-squelettique est l'une des plus communes rencontrée en clinique, il était important d'utiliser un modèle approprié. L'ensemble des études sur les réflexes somato-viscéraux (Tallarida et al. 1979; Swenson and Sato 1984; Kimura et al. 1995; Budgell et al. 1997; Sato et al. 1997; Budgell and Suzuki 2000) s'est concentrée sur des stimulations aiguës. Ils ont généralement utilisé de brèves

stimulations électriques des nerfs afférents et de la peau, ou une stimulation mécanique des articulations ou de la peau. Pour notre part, le choix des sites de stimulation, c'est-à-dire, les muscles paravertébraux, ainsi que l'utilisation du CFA comme agent algésique, avaient pour but de créer des conditions semblables à celles de patients avec douleur thoracique chronique. De plus, l'utilisation d'une solution saline hypertonique (6 %) fut choisie comme source de douleur musculaire aiguë. Les injections de solution saline hypertonique évoquent une activité nociceptive aiguë, autant chez le rat que chez l'humain (Svensson et al. 1995; Ro et al. 2007), et ont été démontrées comme le stimulus le plus efficace pour recruter les fibres afférentes primaires du groupe IV (Hoheisel et al. 2005).

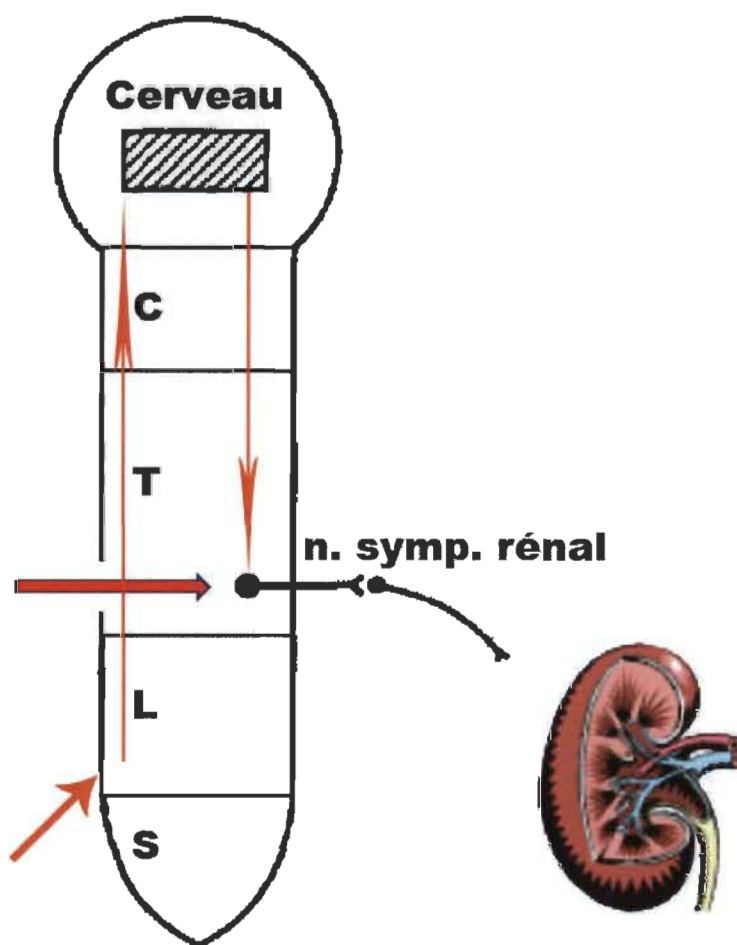
Comme nous l'avons montré précédemment, une stimulation nociceptive aiguë des muscles paravertébraux induit des changements plus importants du débit sanguin rénal lorsque les injections sont faites à T10, soit aux mêmes segments que l'organisation préganglionnaire sympathique rénale telle que montrée par les études antérieures.

Tel que mentionnée dans l'Introduction, l'innervation sympathique du rein prend son origine au niveau des neurones sympathiques préganglionnaires. Les corps cellulaires de ces neurones sont situés au sein de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière, comprise entre les niveaux T5 et T13, avec le plus grand nombre de neurones préganglionnaires au niveau de T10 (Schramm et al. 1993). Nos résultats ont clairement révélé qu'une stimulation aiguë appliquée à T10 entraînait des changements plus importants du débit sanguin rénal, et ce, pour tous les groupes testés, comparativement à une stimulation aiguë appliquée ailleurs qu'aux segments correspondant à l'organisation préganglionnaire sympathique rénale. Les réponses somato-rénales sont schématisées à la figure 4.2. Ces résultats sont compatibles avec ceux d'autres études animales démontrant une modulation segmentaire des réflexes somato-sympathiques par des stimulations afférentes



du tronc chez des rats avec système nerveux central intact. Araki et al. (1984) ont démontré que des stimulations du tronc pouvaient moduler l'activité du nerf sympathique surrénalien et des taux de sécrétions des catécholamines. À l'instar de nos résultats, une stimulation mécanique douloureuse des mêmes tissus, soit par pincement, entraînait une augmentation de l'activité du nerf sympathique surrénal et des taux de sécrétions des catécholamines, à 125 % du niveau contrôle (Araki et al. 1984). De même, une stimulation nociceptive mécanique (pincement) du tronc diminue de manière réflexe la pression pylorique (Sato et al. 1975) et plus récemment, il a été démontré qu'une stimulation nociceptive chimique des tissus interépineux entraîne une augmentation de l'activité du nerf sympathique gastrique et une diminution associée de la motilité gastrique (Budgell and Suzuki 2000). Les réponses les plus robustes observées étaient lorsque l'on injectait l'agent algésique, la capsaïcine, au niveau des tissus de T11-T12, aux mêmes segments de l'organisation préganglionnaire sympathique de l'estomac, soit aux niveaux T10-T12. Nos résultats ainsi que l'ensemble de ceux mentionnés ci-dessus, suggèrent tous une modulation par des réseaux spinaux, impliquant certains interneurons et les fibres sympathiques préganglionnaires. Ceci est compatible avec ce qui a été postulé pour les systèmes sympathiques lombaires (Jänig 2006). Ce qui surprend de nos résultats, c'est qu'ils indiquent clairement que l'inflammation chronique n'altère pas la réponse normale de changements de débit sanguin rénal évoqué par des injections de solution saline hypertonique. Par contre, comme mentionnés dans la section 4.1, avec l'inflammation chronique, les changements de débit sanguin rénal évoqués par les stimulations électriques sont atténués. Ces divergences pourraient être attribuables à la différence entre le recrutement des fibres afférentes par les deux différents stimuli utilisés. Les stimulations électriques sont bien connues pour exciter à forte intensité les fibres myélinisées et non myélinisées (Sato et al. 1986). L'injection de saline hypertonique, quant à elle, évoque des décharges des mêmes fibres, mais semble plus sélective pour les fibres afférentes à

conduction lente, probablement en raison des forts changements osmotiques créés par la solution hypertonique (Graven-Nielsen et al. 2008).



**Figure 4.2 : Schéma des réponses somato-rénales.** Les réflexes somato-rénaux induits par des stimulations des membres sont d'origine supraspinale (flèche orange). Des stimulations des afférences segmentaires permettent des réponses des voies supraspinales (flèches oranges) et de centres réflexes spinaux (flèche rouge), permettant une modulation segmentaire du réflexe somato-rénal.



### **4.3 Limites de l'étude**

Mais nos résultats présentent toutefois quelques limites. Une limite de cette étude est que nous ne pouvons pas mesurer le débit sanguin absolu du rein, qui pourrait être diminué même au niveau de base. Des altérations dans l'activité du nerf sympathique rénal produisent des changements de débit sanguin rénal ainsi que du taux de filtration glomérulaire. Le taux de filtration glomérulaire pourrait nous renseigner un peu plus sur les changements au niveau de base induits par la douleur vertébrale chronique. De plus, des enregistrements électrophysiologiques nous permettraient de quantifier l'activité du nerf sympathique rénal et des nerfs sympathiques cardiaques afin de mieux décrire les changements somato-rénaux observés. Contrairement aux mesures de débit sanguin rénal, les enregistrements électrophysiologiques ne sont pas influencés par tous les changements cardio-vasculaires simultanés.

### **4.4 Application des résultats**

Quelle est la portée de nos résultats chez l'humain? Tout d'abord, il faut savoir que les douleurs au dos affectent un jour ou l'autre 80 % de la population selon Statistiques Canada, consulté en 2011. Le Canada est un des pays avec l'incidence la plus élevée de douleurs au dos (Manchikanti et al. 2009). Elles constituent la première cause de limitation chez les moins de 45 ans, la deuxième cause la plus fréquente de visite chez le médecin, la troisième cause la plus commune de chirurgie et la cinquième cause d'admission hospitalière (Andersson 1999). Une proportion importante, environ 10 % développera une chronicité (Manchikanti et al. 2009), et au Canada, les maux de dos chroniques constituent la deuxième condition chronique en importance (Schultz and Kopec 2003). Nos résultats sont les premiers à démontrer l'impact de la douleur vertébrale chronique sur les réponses somato-rénales, et de manière générale, sur une réponse somato-autonomique. Certes, nos résultats ne peuvent pas encore être transposés chez l'humain. Est-il possible que des gens souffrant de

douleurs chroniques de la région thoracique et thoracolombaire aient des altérations de la fonction autonome de leurs organes? Même si ces changements étaient sous-cliniques, la question est légitime et une autre importante interrogation concerne la conséquence à long terme de ces altérations somato-autonomiques induites par la douleur chronique. De plus, ces nouvelles connaissances permettront sans aucun doute de contribuer à la compréhension des mécanismes sous-jacents aux différentes thérapies physiques, par exemple aux manipulations vertébrales et aux différentes formes d'acupuncture, qui rapportent dans certains cas des impacts viscéraux lors du traitement de douleurs vertébrales chroniques (Budgell 2000).

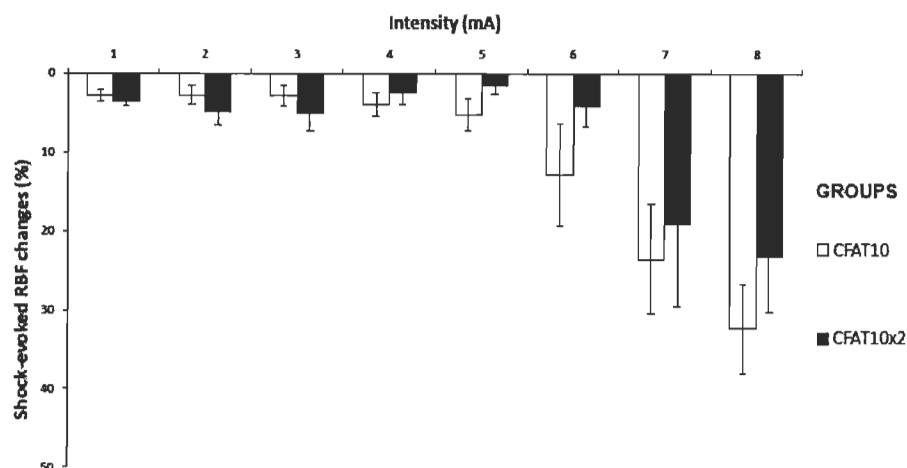
#### **4.5 Perspectives de futures recherches**

Suite aux résultats obtenus, les perspectives de futures recherches sont nombreuses. Une importante interrogation à laquelle notre étude n'a pas répondu est l'effet de la dose sur les réponses obtenues. Ayant démontré l'effet de la douleur chronique vertébrale sur la plasticité des réflexes somato-rénaux, nous nous sommes questionnés sur l'effet d'une augmentation de la dose de l'agent algésique utilisé, le CFA, sur les mêmes mesures reliées à la régulation du débit sanguin rénal. Nous avons réalisé une étude préliminaire sur 3 rats Wistar avec une double injection de CFA au niveau des muscles paravertébraux de T10-T11. Les résultats ne présentaient aucune différence significative et un sommaire de ces résultats est présenté à la figure 4.3. De travaux futurs pourront cependant investiguer les effets de la dose à d'autres niveaux vertébraux, par exemple T2, sur les mêmes mesures pour ce qui est de la régulation du débit sanguin rénal. De plus, même si une douleur soutenue pour une période de 12 jours induit des changements chroniques chez le rat, une autre interrogation se présente. Quel serait l'effet d'une douleur chronique soutenue plus de 12 jours sur la plasticité des réflexes somato-rénaux? De futurs travaux pourront sans aucun doute répondre à cette question. Par exemple, il serait intéressant de faire le même paradigme expérimental en

doublant le temps, soit 24 jours, entre l'injection de CFA et le jour de l'expérience.

Afin de mieux comprendre les mécanismes neurophysiologiques en cause, d'autres travaux devront évaluer l'effet de la douleur chronique sur la modulation de réponses somato-autonomiques provenant d'autres fibres préganglionnaires sympathiques. De plus, il serait aussi intéressant d'évaluer l'effet de la douleur chronique sur la motilité gastrique, et les réponses somato-gastriques, puisque les neurones sympathiques préganglionnaires gastriques sont aussi issus de la région de T10 (majoritairement T10 à T12) (Strack et al. 1988), tout comme pour le rein, et l'effet de stimulations aiguës est aussi déjà bien documenté pour ce qui est de la réponse somato-gastrique.

Les douleurs thoraciques chroniques d'origine musculo-squelettiques sont fréquemment rencontrées en clinique. Nous ouvrons donc la porte à ce que de futures études chez l'humain examinent la modulation des réponses sympathiques chez des volontaires sains. Il sera alors pertinent d'évaluer la modulation des mêmes réponses sympathiques chez une population de patients avec douleurs thoraciques chroniques. L'impact de traitements, tant du point de vue de la thérapie physique que du traitement pharmacologique, pourra éventuellement être évalué afin de neutraliser les effets néfastes de la douleur chronique sur les réflexes somato-autonomiques.

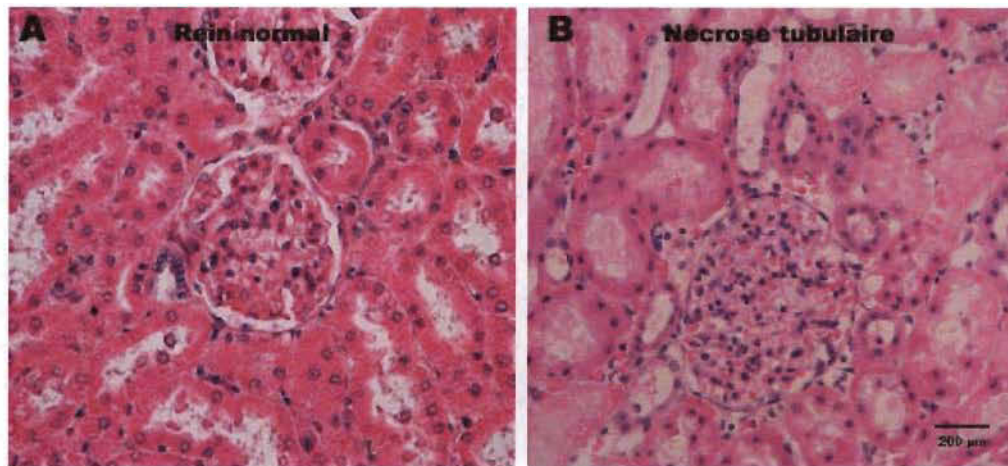


**Figure 4.3 : Impact d'une augmentation de la dose de CFA.** Graphique illustrant les changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs selon différentes intensités. Le groupe CFAT10X2 (n=3) ne démontre pas de différence significative comparativement au groupe CFAT10.

#### 4.6 Changements nécrotiques du rein : un cas intrigant

Chez un rat avec douleur chronique, nous avons observé des changements macroscopiques d'apparence nécrotique au rein gauche. Cet animal a bien entendu été exclu de l'étude. Illustrée à la figure 4.4, l'histologie du rein a révélé une nécrose tubulaire apparente (figure 4.4B). Même s'il s'agit d'un cas isolé, le fait que nos résultats indiquent que la douleur vertébrale chronique peut altérer la régulation du débit sanguin rénal nous porte à croire que des changements structuraux rénaux peuvent subvenir. Prochainement, nous procèderons à la caractérisation histologique des changements rénaux

chez des rats avec douleur vertébrale chronique pour vérifier ce résultat intrigant.



**Figure 4.4 : Histologie d'un rein normal (A) et d'un rein pathologique avec nécrose tubulaire (B).** (tissu fixé à la formaline, coupes paraffinées (5-µm) colorées à l'hématoxyline-érythrosine-safran)

#### 4.7 Conclusion

La présente étude a validé un bon modèle animal de douleur vertébrale chronique. La douleur chronique au niveau de T2 atténue les changements de débit sanguin rénal évoqués par les chocs à la patte postérieure gauche. Une stimulation nociceptive aiguë, sous forme d'injection de solution saline hypertonique des muscles paravertébraux induit des réponses somato-rénales plus importantes lorsque la stimulation est au niveau de T10, chez tous les groupes. Les changements de débit sanguin rénal induits par l'injection de salin hypertonique n'ont pas été affectés par l'inflammation chronique. La douleur chronique, T2 et T10, entraîne une augmentation des changements de fréquence cardiaque évoqués par les chocs à la plus haute intensité de stimulation.

Finalement, cette étude est la première à démontrer que la douleur vertébrale chronique entraîne des modifications d'une fonction du système

nerveux autonome comme la régulation du débit sanguin rénal. Cependant, les mécanismes restent à déterminer. Des expériences utilisant la naloxone pourront élucider la contribution des systèmes descendants dans la plasticité des réflexes somato-rénaux. D'un point de vue biochimique, il sera intéressant de caractériser les changements neuroinflammatoires spinaux. En immunohistochimie, il sera aussi intéressant de localiser et caractériser les neurones affectés. De plus, la caractérisation des changements tissulaires rénaux chez des rats avec douleur vertébrale chronique permettra de documenter les effets potentiellement néfastes des maux de dos chroniques sur les organes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Andersson, G. B. J. (1999). "Epidemiological features of chronic low-back pain." *Lancet* 354(9178): 581-585.
- Araki, T., Ito, K., Kurosawa, M. and Sato, A. (1984). "Responses of adrenal sympathetic nerve activity and catecholamine secretion to cutaneous stimulation in anesthetized rats." *Neuroscience* 12(1): 289-299.
- Barajas, L., Liu, L. and Powers, K. (1992). "Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin." *Can J Physiol Pharmacol* 70(5): 735-749.
- Baron, R., Jänig, W. and With, H. (1995). "Sympathetic and afferent neurones projecting into forelimb and trunk nerves and the anatomical organization of the thoracic sympathetic outflow of the rat." *J Auton Nerv Syst* 53(2-3): 205-214.
- Budgell, B., Sato, A., Suzuki, A. and Uchida, S. (1997). "Responses of adrenal function to stimulation of lumbar and thoracic interspinous tissues in the rat." *Neurosci Res* 28(1): 33-40.
- Budgell, B. and Suzuki, A. (2000). "Inhibition of gastric motility by noxious chemical stimulation of interspinous tissues in the rat." *J Auton Nerv Syst* 80(3): 162-168.
- Budgell, B. (2000) "Reflex effects of subluxation: the autonomic nervous system". *J Manipulative Physiol Ther* 23(2):104-106.
- Budgell, B. S., Hotta, H. and Sato, A. (1998). "Reflex responses of bladder motility after stimulation of interspinous tissues in the anesthetized rat." *J Manipulative Physiol Ther* 21(9): 593-599.
- Cannon, W. B. (1929). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. An account of recent researches into the function of emotional excitement.* McGrath Publishing Company, College Park, Maryland, USA, pp. 348-374.



- Cannon, W. B., Lewis, J. T. and Britton, S. W. (1926). "Studies on the conditions of activity in endocrine glands: XVII. A Lasting Preparation of the Denervated Heart for Detecting Internal Secretion, with Evidence for Accessory Accelerator Fibers from the Thoracic Sympathetic Chain." *Am J Physiol* 77(2): 326-352.
- Chacur, M., Lambertz, D., Hoheisel, U. and Mense, S. (2009). "Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: An immunohistochemical and behavioural study in rats." *Eur J Pain* 13(9): 915-923.
- Chaouch, A. and Besson, J. M. (1986). "Peripheral and spinal mechanisms of nociception." *Rev Neurol (Paris)* 142(3): 173-200.
- Coote, J. H. (1975). "Physiological significance of somatic afferent pathways from skeletal muscle and joints with reflex effects on the heart and circulation." *Brain Res* 87(2-3): 139-144.
- Cramer, G. and Darby, S. (2005). *Basic and clinical anatomy of the Spine, Spinal Cord and ANS* Elsevier Mosby, St-Louis, Missouri, USA, pp. 411-479.
- Damjanov, I. and Linder, J. (1996). *Anderson's pathology*. Mosby, St Louis, USA, pp. 2653-2686.
- Davis, G. and Johns, E. J. (1995). "Renal sympathetic nerve responses to somato-sensory nerve stimulation in normotensive rats." *J Auton Nerv Syst* 54(1): 59-70.
- Desmarais, A., Descarreaux, M., Houle, S. and Piché, M. (2011). "Tuning the gain of somato-sympathetic reflexes by stimulation of the thoracic spine in humans." *Neurosci Lett* 490(2): 107-111.
- Diehl, B., Hoheisel, U. and Mense, S. (1988). "Histological and neurophysiological changes induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat." *Inflamm Res* 25(3): 210-213.
- Djoughri, L. and Lawson, S. N. (2004). "A[beta]-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals." *Brain Res Rev* 46(2): 131-145.

- Dorward, P. K., Burke, S. L., Jänig, W. and Cassell, J. (1987). "Reflex responses to baroreceptor, chemoreceptor and nociceptor inputs in single renal sympathetic neurones in the rabbit and the effects of anaesthesia on them." *J Auton Nerv Syst* 18(1): 39-54.
- Doumas, M., Faselis, C. and Papademetriou, V. (2011). "Renal Sympathetic Denervation and Systemic Hypertension." *Am J Cardiol* 105(4): 570-576.
- Fazalbhoy, A., Birznieks, I., Macefield, V. G. (2012). "Individual differences in the cardiovascular responses to tonic muscle pain: parallel increases or decreases in muscle sympathetic nerve activity, blood pressure, and heart rate" *Exp Physiol* published ahead of print May 11.
- Felten, D. L. and Jozefowicz, R. F. (2003). *Atlas de neurosciences humaines de Netter*. Masson, Paris, France, pp. 264-265.
- Ferguson, M., Ryan, G. B. and Bell, C. (1986). "Localization of sympathetic and sensory neurons innervating the rat kidney." *J Auton Nerv Syst* 16(4): 279-288.
- Fukuoka, H., Kawatani, M., Hisamitsu, T. And Takeshige, C. (1994) "Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. *Brain Res* 657(1): 133-140.
- Goldsmith, S. R., Sobotka, P. A. and Bart, B. A. (2010). "The Sympathorenal Axis in Hypertension and Heart Failure." *J Card Fail* 16(5): 369-373.
- Graven-Nielsen, T., Arendt-Nielsen, L. and Mense, S. (2008). *Fundamentals of Musculoskeletal Pain*. IASP press, Seattle, USA, pp. 3-43.
- Hao, S., Mata, M., Glorioso, J. C. and Fink, D. J. (2006) "HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain* 2 (6): 1-9.
- Hoheisel, U., Unger, T. and Mense, S. (2005). "Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat." *Pain* 114(1): 168-176.
- Hooshmand, H. (1993). *Chronic Pain Reflex Sympathetic Dystrophy Prevention and Management*. CRC Press, Florida, USA, pp. 33-57.

- Horeysek G. and Janig W. (1974) "Reflexes in postganglionic fibres within skin and muscle nerves after noxious stimulation of the skin" *Exp Brain Res* 20(2):125-134.
- Jänig, W. (2006). *The integrative action of the autonomic nervous system*. Cambridge university press, Cambridge, UK, pp. 331-349.
- Jobling, P. (2011). "Autonomic control of the urogenital tract" *Auton Neurosci* 165:113-126.
- Katholi, R. E. and Rocha-Singh, K. J. (2009). "The Role of Renal Sympathetic Nerves in Hypertension: Has Percutaneous Renal Denervation Refocused Attention on Their Clinical Significance?" *Prog Cardiovasc Dis* 52(3): 243-248.
- Kimura, A., Ohsawa, H., Sato, A. and Sato, Y. (1995). "Somatocardiovascular reflexes in anesthetized rats with the central nervous system intact or acutely spinalized at the cervical level." *Neurosci Res* 22(3): 297-305.
- Kimura, A., Sato, A., Sato, Y. and Suzuki, A. (1996). "Single electrical shock of a somatic afferent nerve elicits A- and C-reflex discharges in gastric vagal efferent nerves in anesthetized rats." *Neurosci Lett* 210(1): 53-56.
- Kimura, A., Sato, A., Sato, Y. and Suzuki, H. (1996). "A- and C-reflexes elicited in cardiac sympathetic nerves by single shock to a somatic afferent nerve include spinal and supraspinal components in anesthetized rats." *Neurosci Res* 25(1): 91-96.
- Langley, J. N. (1891). "On the Course and Connections of the Secretory Fibres supplying the Sweat Glands of the Feet of the Cat." *J Physiol* 12(4): 347-390.
- Lebars, D, Dickenson A., H. and Besson, J., M. (1979). "Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat." *Pain* 6(3):283-304.
- LeBars, D., Villanueva, L., Bouhassira D. and Willer, J., C. (1992). "Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man." *Patol Fiziol Eksp Ter* 4(4): 55-65
- Léger, J. M, Baron, J. C., Cros, D, Maugière, F., Meder, J. F., Bracard, S. and Touboul, P.G. (2000) *Interprétation des examens complémentaires en neurologie. Traité de Neurologie*, Doin, Paris, France, pp. 269-273.

- Li, W.-M., Wu, G.-C., Arita, H. and Hanaoka, K. (2002). "Acupuncture stimulation inhibits somato-renal sympathetic A- and C-reflexes in anesthetized rats." *Acupunct Electrother Res* 27(2): 119-127.
- Loewy, A. and Spyer, K. (1990). *Central regulation of autonomic functions*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 4-10.
- Lohmeier, T. E. (2001). "The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation." *Am J Hypertens* 14(6, Supplement 1): S147-S154.
- Maggi, C. A. and Meli, A. (1986). "Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems Part 1: General considerations." *Cell Mol Life Sci* 42(2): 109-114.
- Manchikanti, L., Singh, V., Datta, S., Cohen, S. P. and Hirsch, J. A. (2009). "Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain." *Pain Physician* 12(4): E35-E70.
- McEwen, B. S. and Kalia, M. (2010). "The role of corticosteroids and stress in chronic pain" *Metabolism* 59(S1): S9-S15.
- Millan, M., J. (2002). "Descending control of pain." *Prog Neurobiol* 66(6): 355-474.
- Noguchi, E., Ohsawa, H., Kobayashi, S., Shimura, M., Uchida, S. and Sato, Y. (1999). "The effect of electro-acupuncture stimulation on the muscle blood flow of the hindlimb in anesthetized rats." *J Auton Nerv Syst* 75(2-3): 78-86.
- Pocock, G. And Richards, C. D. (2004). *Physiologie Humaine les fondements de la medicine*. Masson, Paris, France, pp. 369-394.
- Pickar, J. G. (2002). "Neurophysiological effects of spinal manipulation." *Spine J* 2(5): 357-371.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., Lamantia, A. S., McNamara, J. O. and Williams, S. M. (2001). *Neurosciences*. de Boeck, Bruxelles, Belgique, pp. 443-467.
- Pyner, S. and Coote, J. H. (1994). "Evidence that sympathetic preganglionic neurones are arranged in target-specific columns in the thoracic spinal cord of the rat." *J Comp Neurol* 342(1): 15-22.

- Rhudy, J. L., McCabe, K. M. and Williams, A. E. (2007). "Affective modulation of autonomic reactions to noxious stimulation." *Int J Psychophysiol* 63(1): 105-109.
- Ro, J. Y., Capra, N. F., Lee, J.-s., Masri, R. and Chun, Y.-H. (2007). "Hypertonic saline-induced muscle nociception and c-fos activation are partially mediated by peripheral NMDA receptors." *Eur J Pain* 11(4): 398-405.
- Robertson, D. (2004). *Primer on the Autonomic Nervous System*, Elsevier, San Diego, CA, USA, 158.
- Sato, A. (1972). "Somato-sympathetic reflex discharges evoked through supramedullary pathways." *Pflugers Arch* 332(2): 117-126.
- Sato, A. (1973). "Spinal and medullary reflex components of the somato-sympathetic reflex evoked by stimulation of the group IV somatic afferents." *Brain Res* 51: 307-318.
- Sato, A., Sato, Y. and Schmidt, R. F. (1984). "Changes in blood pressure and heart rate induced by movements of normal and inflamed knee joints." *Neurosci Lett* 23(53): 55-60.
- Sato, A., Sato, Y. and Schmidt, R. F. (1997). "The impact of somatosensory input on autonomic functions." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 130: 1-328.
- Sato, A., Sato, Y. and Schmidt, R. F. (1981). "Heart rate changes reflecting modifications of efferent cardiac sympathetic outflow by cutaneous and muscle afferent volleys" *J Auton Nerv Syst* 4: 231-247.
- Sato, A., Sato, Y., Shimada, F. and Torigata, Y. (1975). "Changes in gastric motility produced by nociceptive stimulation of the skin in rats." *Brain Res* 87(2-3): 151-159.
- Sato, A., Sato, Y., Shimada, F. and Torigata, Y. (1976). "Varying changes in heart rate produced by nociceptive stimulation of the skin in rats at different temperatures." *Brain Res* 110(2): 301-311.
- Sato, A. and Swenson, R. S. (1984). "Sympathetic nervous system response to mechanical stress of the spinal column in rats" *J Manipulative Physiol Ther* 7(3): 141-147.

- Schmidt, R. F., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjörk, E. and Handwerker, H. (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." *J Neurosci* 15: 333-341.
- Scholz, J., Broom, D. C., Youn, D.-H., Mills, C. D., Kohno, T., Suter, M. R., Moore, K. A., Decosterd, I., Coggeshall, R. E. and Woolf, C. J. (2005). "Blocking Caspase Activity Prevents Transsynaptic Neuronal Apoptosis and the Loss of Inhibition in Lamina II of the Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury." *J Neurosci* 25(32): 7317-7323.
- Schramm, L. P., Strack, A. M., Platt, K. B. and Loewy, A. D. (1993). "Peripheral and central pathways regulating the kidney: a study using pseudorabies virus." *Brain Res* 616(1-2): 251-262.
- Schultz, S. E. and Kopec, J. A. (2003). "Impact of chronic conditions." *Health Rep* 14(4): 41-53.
- Sherrington, C. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*. Yale University Press, New Haven, USA, pp. 151-180.
- Shlipak, M. G. and Massie, B. M. (2004). "The Clinical Challenge of Cardiorenal Syndrome." *Circulation* 110(12): 1514-1517.
- Stornetta, R. L., Morrison, S. F., Ruggiero, D. A. and Reis, D. J. (1989). "Neurons of rostral ventrolateral medulla mediate somatic pressor reflex." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 256(2): R448-462.
- Strack, A. M., Sawyer, W. B., Marubio, L. M. and Loewy, A. D. (1988). "Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat." *Brain Res* 455(1): 187-191.
- Svensson, P., Arendt-Nielsen, L., Nielsen, H. and Larsen, J. K. (1995). "Effect of chronic and experimental jaw muscle pain on pain-pressure thresholds and stimulus-response curves." *J Orofac Pain* 9(4): 347-356.
- Swenson, R. and Sato, A. (1984). "Sympathetic nervous system response to mechanical stress of the spinal column in rats." *J Manipulative Physiol Ther* 7: 141-147.

- Tallarida, G., Baldoni, F., Peruzzi, G., Brindisi, F., Raimondi, G. and Sangiorgi, M. (1979). "Cardiovascular and respiratory chemoreflexes from the hindlimb sensory receptors evoked by intra-arterial injection of bradykinin and other chemical agents in the rabbit." *J Pharmacol Exp Ther* 208(2): 319-329.
- Terui, N., Numao, Y., Kumada, M. and Reis, D. J. (1981). "Identification of the primary afferent fiber group and adequate stimulus initiating the trigeminal depressor response." *J Auton Nerv Syst* 4(1): 1-16.
- Tortora, G. J. and Grabowski S. R. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*. Éditions du Renouveau Pédagogique, Montréal, Canada. pp. 619-622.
- Valentini, M. and Parati, G. (2009). "Variables Influencing Heart Rate." *Prog Cardiovasc Dis* 52(1): 11-19.
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Smith, K. P., Martin, D. and Maier S.F. (1994). "Characterization of cytokine-induced hyperalgesia". *Brain Res* 654(1):15-26.